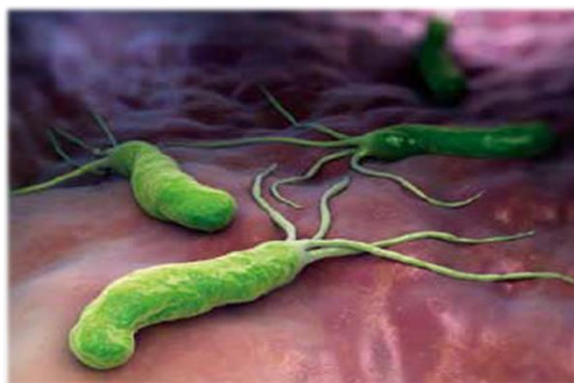




**Universidade Católica Portuguesa
Faculdade de Engenharia**



Melhoramento de uma vacina multi-antigénica contra a *Helicobacter pylori*

Sónia Maria Rendeiro Vaz

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica: Especialização em Engenharia Biomolecular, de
Tecidos e de Órgãos**

Júri

Prof.º Doutor Manuel Barata Marques (Presidente)

Prof.^a Doutora Cecília Calado (Orientadora)

Prof.º Doutor António de Almeida (Convidado)

Setembro de 2014



**Universidade Católica Portuguesa
Faculdade de Engenharia**

**Melhoramento de uma vacina multi-antigénica contra
a *Helicobacter pylori***

Sónia Maria Rendeiro Vaz

**Dissertação para obtenção do Grau de Mestre em Engenharia
Biomédica: Especialização em Engenharia Biomolecular, de
Tecidos e de Órgãos**

Júri

Prof.º Doutor Manuel Barata Marques (Presidente)

Prof.ª Doutora Cecília Calado (Orientadora)

Prof.º Doutor António de Almeida (Convidado)

Setembro de 2014

*"A mudança não assegura necessariamente progresso, mas o progresso implacavelmente
requer mudança."*

Henry S. Commager

RESUMO

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria que coloniza o estômago de cerca de metade da população mundial, estando associada ao aumento do risco de desenvolvimento de gastrites, úlceras gástricas e duodenais, linfomas associados às mucosas e adenocarcinomas gástricos. Os problemas emergentes da terapia atual, baseada em antibióticos, torna a vacina uma alternativa promissora. No entanto, a elevada variabilidade genética desta bactéria tem dificultado o desenvolvimento de vacinas eficientes. Uma vacina multi-antigénica poderá constituir uma estratégia para ultrapassar esta limitação e obter-se uma vacina que represente as estirpes existentes mundialmente.

Este trabalho visa aperfeiçoar uma vacina baseada em DNA plasmídico e proteína recombinante, constituída por múltiplos epítomos de diferentes antígenos de *H. pylori*, e avaliar a capacidade desta superar a imuno-variabilidade existente entre diferentes estirpes. Para aperfeiçoar a vacina substituiu-se o epítomo da GroEL, devido à sua homologia com proteínas humanas, por um epítomo da NapA, devido à relevância deste fator de virulência na infecção crónica. Observou-se nos estudos de imunização em murganhos, com estas duas novas construções de vacinas (proteica e de DNA plasmídico), uma resposta imunitária. Em *Western Blot* observou-se que os anticorpos policlonais gerados durante estas imunizações reconheceram todos os extractos proteicos obtidos de 15 estirpes de *H. pylori*, provenientes de regiões geográficas muito diferentes e obtidas de pacientes com diversas patologias gástricas.

Os resultados obtidos corroboram a potencialidade de uma vacina multi-antigénica para contornar a elevada imuno-variabilidade da *H. pylori* e por consequência este tipo de construção pode constituir a base de uma vacina futura anti-*H. pylori*.

Palavras-chave: *Helicobacter pylori*, seleção antígenos, imuno-variabilidade, vacina multi-antigénica, vacina de DNA, antígenos recombinantes.

ABSTRACT

Helicobacter pylori is a bacterium that colonizes the stomach about half the world's population, being associated with increased risk of various diseases such gastritis, gastric and duodenal ulcers, mucosa-associated lymphoid tissue lymphomas and gastric adenocarcinomas. Emerging problems of the current therapy, based on antibiotics, makes the vaccine a promising alternative. However, the high genetic variability of this bacterium has hampered the development of efficient vaccines. A multi-antigenic vaccine could be a strategy to overcome this limitation and obtain a vaccine that represents globally the existing world strains.

This work aims to improve an approach based on plasmid DNA and recombinant protein vaccine, consisting of multiple epitopes from different *H. pylori* antigens, and evaluate the ability to overcome the immune variability between different strains. To improve the vaccine was replaced the epitope of GroEL, due to its homology with human proteins, for a epitope of NapA, due to the relevance of this virulence factor in chronic infection. It was observed in the immunization studies in mice, with these two new constructions of vaccines (plasmid DNA and protein), an immune response. In Western blot we found that polyclonal antibodies generated during these immunizations recognized all protein extracts obtained from 15 *H. pylori* strains coming from different geographical regions and obtained from patients with various gastric disorders.

The results confirm the potential of a multi-antigen vaccine to overcome the high immune variability of the *H. pylori* and and therefore this construction can form the basis of future vaccine *H. pylori*.

Keywords: *Helicobacter pylori*, antigen selection, immune variability, multi-antigen vaccine, DNA vaccine, recombinant antigen.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, um agradecimento à minha orientadora, Professora Doutora Cecília Calado, por me proporcionar todas as condições para a concretização deste trabalho, sob a sua valiosa orientação científica. Muito obrigada pelo seu apoio, motivação e disponibilidade bem como as chamadas de atenção e conselhos que visaram desenvolver o meu espírito científico. Todos os conhecimentos que me transmitiu seguramente contribuíram em muito para a minha futura vida profissional.

Em segundo, queria agradecer à Professora Doutora Andreia Couto por todo o apoio que me deu, pela sua disponibilidade e ensinamentos que em muito contribuíram para a concretização deste trabalho. Obrigada ainda pela preocupação que sempre demonstrou comigo, pelas palavras de amizade e pela motivação, que em tanto contribuíram para ter ânimo em desvendar todos os problemas que foram surgindo.

À Professora Doutora Lúcia Gonçalves [Professora Doutora da Faculdade de Farmácia da Universidade de Lisboa (FFUL)] por me ter acolhido tão prontamente no seu laboratório, pela sua preocupação em transmitir todos os seus conhecimentos e pela sua disponibilidade. Obrigada pela sua constante simpatia e alegria. Foi bastante satisfatório conhecer uma pessoa que demonstra ter um grande prazer em ensinar.

À Faculdade de Engenharia da Universidade Católica Portuguesa (FEUCP), na pessoa do Professor Doutor Manuel Barata Marques, Diretor da Faculdade, por me ter proporcionado as condições básicas necessárias para a realização deste projeto e pelo apoio e preocupação que sempre demonstrou ao longo deste trabalho.

Ao meu amigo Kevin Sales pelo encorajamento que sempre me deu, pela sua demonstração de preocupação e pelas palavras de ânimo que em tanto me ajudaram a acreditar em mim. Uma grande obrigada também pelos bons momentos que partilhamos ao longo destes 6 anos e por teres sido o melhor parceiro de trabalhos de grupo, apesar de todas as “discussões” que simplesmente visavam obtermos o melhor trabalho possível. Para além de um colega de trabalho tornaste-te ao longo dos anos um amigo. Obrigada por acreditares e confiares tanto nas minhas capacidades.

A todos os amigos que conheci na faculdade e que me acompanharam ao longo do meu percurso académico, um especial agradecimento à Catarina Gama e ao João Mesquita, por todos

os momentos maravilhosos que passamos, pelas horas de estudo juntos, pela vossa amizade e pela força que sempre me deram.

À minha família, por todo o apoio e preocupação que demonstraram ao longo do meu percurso. Bem como por me ajudarem a traçar o meu caminho e tornarem isto tudo possível.

A todos os meus amigos de sempre, por toda a amizade ao longo dos anos, pelos momentos vividos e partilhados e por continuarem a fazer parte da minha vida. Um agradecimento em especial ao meu “irmão” Claudio Santos, pelo seu apoio incondicional e por me apoiar nos momentos em que eu mais precisei de força e motivação. Por acreditar tanto em mim.

Por fim, mas não menos importante, ao meu namorado Carlos Teles, uma vez que sem ele tudo teria sido bem mais difícil. Obrigada por todo o carinho, amor e companhia que me deste ao longo deste percurso, que se revelaram cruciais para tornar cada dia mais feliz e alegre. Obrigada por me dares força e ânimo, por me motivares, pela paciência nos dias menos bons e por demonstrares orgulho na pessoa que sou. Obrigada por todos os momentos maravilhosos que me proporcionaste e por seres a pessoa encantadora que és.

Agradece-se o apoio financeiro da Fundação da Ciência e Tecnologia (FCT) (PTDC/BIO/69242/2006).

ÍNDICE

| | |
|---|--------------|
| Resumo..... | iii |
| Abstract | iv |
| Agradecimentos..... | v |
| Abreviaturas | xi |
| Lista de Figuras | xiv |
| Lista de Tabelas e Equações..... | xvi |
| CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL | 1 |
| 1. A infecção por <i>H. pylori</i> | 1 |
| 1.1 Estratégias de colonização..... | 2 |
| 1.2 Patogenicidade | 5 |
| 1.3 Variabilidade | 5 |
| 2. Diagnóstico da infecção por <i>H. pylori</i> | 6 |
| 2.1 Métodos invasivos..... | 6 |
| 2.2 Métodos não invasivos | 7 |
| 2.3 Teste de diagnóstico ideal | 8 |
| 3. Erradicação da infecção por <i>H. pylori</i> | 10 |
| 3.1 Erradicação: benéfica ou prejudicial? | 10 |
| 3.2 Linhas de tratamento | 11 |
| 3.3 Recorrência da infecção | 13 |
| 4. Vacinas contra a <i>H. pylori</i> | 13 |
| 4.1 Seleção de antígenos para vacina anti- <i>H. pylori</i> | 16 |
| 4.2 Fatores de virulência | 17 |
| 4.2.1 VacA..... | 18 |

| | |
|--|----|
| 4.2.2 Cag-PAI..... | 19 |
| 4.2.3 Proteínas da membrana externa..... | 21 |
| 4.2.4 Urease..... | 24 |
| 4.2.5 Proteínas flagelares: FlaA e FlaB..... | 25 |
| 4.2.6 Enzimas antioxidantes..... | 26 |
| 4.2.7 GroEL..... | 29 |
| 4.2.8 HpaA | 29 |
| 4.3 Vacina multi-antigénica | 30 |
| 5. Objetivos e estratégias do trabalho..... | 31 |

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS..... 33

| | |
|--|----|
| 1. Construção de plasmídeos recombinados..... | 33 |
| 1.1 pVAX1_6T' | 33 |
| 1.1.1 Isolamento dos fragmentos de interesse..... | 35 |
| 1.1.2 Otimização das condições de ligação do fragmento NAP ao plasmídeo pVAX1 | 36 |
| 1.1.3 Validação da construção pVAX1_6T' | 39 |
| 1.1.3.1 Mapa de restrição..... | 39 |
| 1.1.3.2 Expressão da proteína em culturas de células HEK transfetadas com o plasmídeo pVAX1_6T' | 40 |
| 1.2 pQE30-6T' | 41 |
| 1.2.1 Construção do pQE30_6T' | 41 |
| 1.2.2 Validação da construção pQE30_6T' | 42 |
| 1.2.2.1 Mapa de restrição..... | 43 |
| 1.2.2.2 Expressão da proteína recombinante em culturas de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pQE30_6T' | 43 |
| 1.3 Transformação de células competentes..... | 43 |
| 1.4 Isolamento e purificação do DNA plasmídico | 45 |
| 1.5 Quantificação do DNA plasmídico..... | 45 |

| | | |
|--|--|-----------|
| 1.6 | Elektroforese em gel de agarose | 45 |
| 1.7 | Purificação de DNA em gel de agarose | 46 |
| 2. | Produção de antígeno 6T' a partir de <i>Escherichia coli</i> NZY5α transformadas com o plasmídeo pQE30_6T' | 46 |
| 2.1 | Otimização da expressão da proteína | 46 |
| 2.2 | Purificação de proteínas | 46 |
| 2.3 | SDS-PAGE..... | 47 |
| 2.4 | <i>Western Blot</i> | 48 |
| 2.5 | Quantificação de proteínas | 48 |
| 3. | Ensaio <i>in vivo</i> | 49 |
| 3.1 | Crescimento das estirpes de <i>H. pylori</i> | 49 |
| 3.2 | Preparação do antígeno 6T' | 51 |
| 3.3 | Estudo <i>in vivo</i> em murganhos..... | 52 |
| 3.4 | Recolha das amostras de soro e análise da resposta imunológica | 53 |
| 3.5 | Quantificação da resposta imunológica..... | 53 |
| 3.6 | <i>Western Blot</i> | 54 |
| CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO | | 55 |
| 1. | Seleção dos antígenos | 55 |
| 2. | Construção de plasmídeos recombinados..... | 56 |
| 2.1 | pVAX1_6T' | 566 |
| 2.1.1 | Isolamento dos fragmentos de interesse..... | 56 |
| 2.1.2 | Otimização das condições de ligação do fragmento da napA no plasmídeo pVAX1 | 57 |
| 2.1.3 | Validação da construção pVAX1_6T' | 59 |
| 2.1.3.1 | Mapa de restrição..... | 60 |
| 2.1.3.2 | Expressão da proteína em culturas de células HEK 293T transfectadas com o plasmídeo pVAX1_6T' | 61 |
| 2.2 | pQE30_6T' | 64 |

| | |
|---|------------|
| 2.2.1 Construção do pQE30_6T'..... | 64 |
| 2.2.2 Otimização da expressão da proteína recombinante 6T'..... | 65 |
| 2.2.3 Validação da construção pQE30_6T'..... | 67 |
| 2.2.3.1 Mapa de restrição..... | 68 |
| 2.2.3.2 Expressão da proteína recombinante em culturas de <i>E. coli</i> transformadas com o plasmídeo pQE30_6T'..... | 70 |
| 3. Ensaios <i>in vivo</i> | 72 |
| 3.1 Quantificação dos extratos proteicos das estirpes de <i>H. pylori</i> | 72 |
| 3.2 Quantificação das doses administradas..... | 73 |
| 3.3 Estudo do soro produzido em murganhos..... | 74 |
| 3.3.1 Quantificação de imunoglobulinas G..... | 74 |
| 3.3.2 <i>Western Blot</i> | 78 |
| CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS..... | 88 |
| REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS..... | 91 |
| ANEXO - SEQUÊNCIA DO GENÉTICA E RESPETIVA PROTEÍNA DO EPÍTOPO NAPA..... | 105 |

ABREVIATURAS

| | |
|----------------|--|
| AG | - Adenocarcinoma gástrico |
| AhpC | - Do inglês <i>alkyl hydroperoxide detoxification</i> |
| BabA | - Do inglês <i>blood group antigen adhesion</i> |
| BCA | - Do inglês <i>bicinchoninic acid assay</i> |
| BSA | - Do inglês <i>bovine serum albumin</i> |
| CagA | - Do inglês <i>cytotoxin-associated antigen A</i> |
| cag-PAI | - Ilha de patogenicidade <i>cag</i> (do inglês <i>cytotoxin associated gene Pathogenicity Island</i>) |
| CG | - Cancro gástrico |
| CCF | - Células competentes do fabricante |
| CCP | - Células competentes preparadas |
| DMEM | - Do inglês <i>Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture</i> |
| DMEM_10 | - Meio DNEM suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal |
| DNA | - Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> |
| ELISA | - Do inglês <i>enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i> |
| FBS | - Soro bovino fetal (do inglês <i>fetal bovine serum</i>) |
| FEUCP | - Faculdade de Engenharia da Universidade Católica Portuguesa |
| FFUL | - Faculdade de Farmácia de Universidade de Lisboa |
| FISH | - Do inglês <i>fluorescent in situ hybridization</i> |
| FITC | - Isotiocianato de fluoresceína |
| FlaA | - Flagelina A |
| FlaB | - Flagelina B |
| GC | - Gastrite crónica |
| GERD | - Do inglês <i>gastroesophageal reflux disease</i> |
| HEK | - Do ingles <i>human embryonic kidney</i> |
| His | - Histidina |

| | |
|--------------------------------|--|
| HpaA | - Do inglês <i>Helicobacter pylori adhesin A</i> |
| H₂Odd | - Água desionizada esterilizada |
| IFN-γ | - Interferão gama |
| IgA | - Imunoglobulina A |
| IgG | - Imunoglobulina G |
| IL-4 | - Interleucina 4 |
| IL-8 | - Interleucina 8 |
| IP | - Immunoproteômica |
| IPTG | - Do inglês <i>isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside</i> |
| KatA | - Catalase |
| LPS | - Lipopolissacarídeos |
| mAb | - Anticorpo monoclonal (do inglês <i>monoclonal antibody</i>) |
| MALT | - Tecido linfóide associado à mucosa (do inglês <i>mucosa-associated lymphoid tissue</i>) |
| NapA | - Do inglês <i>neutrophil activating protein</i> |
| NCBI | - <i>National Center for Biotechnology Information</i> |
| NK | - Células exterminadoras naturais (do inglês <i>Natural Killer cell</i>) |
| OipA | - Do inglês <i>outer inflammatory protein</i> |
| OMP | - Proteínas da membrana externa (do inglês <i>outer membrane proteins</i>) |
| pAb | - Anticorpo policlonal (do inglês <i>polyclonal antibody</i>) |
| pb | - Pares de base |
| PBS | - Do inglês <i>phosphate buffer saline</i> |
| PCR | - Do inglês <i>polymerase chain reactions</i> |
| PEG | - Polietilenoglicol |
| pUC57_napA | - Plasmídeo pUC57 com fragmento do gene napA da <i>H. pylori</i> |
| pQE30_6T' | - Plasmídeo pQE30 constituído por 6 epítomos de proteínas da <i>H. pylori</i> |
| pVAX1_6T' | - Plasmídeo pVAX1 constituído por 6 epítomos de proteínas da <i>H. pylori</i> |
| PVDF | - Fluoreto de polivinilidene (do inglês <i>polyvinylidene difluoride</i>) |
| rpm | - Rotações por minuto |

| | |
|-----------------|--|
| RUT | - Teste rápido urease (do inglês <i>rapid urease test</i>) |
| s. d. | - Sem data |
| SDS-PAGE | - Do inglês <i>sodium dodecyl sulfate polyacrylamide gel electrophoresis</i> |
| SI | - Sistema imunitário |
| SOC | - Do inglês <i>super optimal broth</i> |
| TAE | - Tris-acetato-EDTA |
| Th1 | - Linfócito T auxiliar do tipo 1 (do inglês <i>T helper type 1</i>) |
| Th2 | - Linfócito T auxiliar do tipo 2 (do inglês <i>T helper type 2</i>) |
| UBT | - Teste de sopro urease (do inglês <i>urease breath test</i>) |
| UD | - Úlcera duodenal |
| UG | - Úlcera gástrica |
| UP | - Úlcera péptica |
| UreA | - Subunidade A da urease |
| UreB | - Subunidade B da urease |
| VacA | - Do inglês <i>vacuolating cytotoxin A</i> |
| VPN | - Valor preditivo negativo |
| VPP | - Valor preditivo positivo |

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura I. 1 - Prevalência mundial da infecção por <i>H. pylori</i> | 2 |
| Figura I. 2 - Mecanismo de colonização da <i>H. pylori</i> na mucosa gástrica evidenciando a relevância da urease | 3 |
| Figura I. 3 - Esquema da constituição da molécula LPS na <i>H. pylori</i> | 4 |
| Figura I. 4 - Alteração do fenótipo das células epiteliais gástricas após infecção por estirpe <i>H. pylori</i> CagA positiva. | 20 |
| | |
| Figura II. 1 - Mapa de restrição do plasmídeo pVAX1_6T..... | 34 |
| Figura II. 2 – Representação esquemática do pUC57_napA..... | 35 |
| Figura II. 3 – Locais de hidrólise e respectivas extremidades originadas pela ação das enzimas BamHI e SmaI..... | 36 |
| | |
| Figura III. 1 - Mapa de restrição do vetor pVAX1_6T'..... | 59 |
| Figura III. 2 – Mapa de restrição para confirmar a presença do fragmento napA (a.) e do fragmento constituído pelos 6 antígenos (b.) na construção pVAX1_6T' , após hidrólise com enzimas de restrição do plasmídeo pVAX1_6T' e subsequente separação em electroforese de agarose dos fragmentos obtidos. | 61 |
| Figura III. 3 - Tranfecção de células HEK 293T com o vetor pVAX1_6T' , e respetivo controlo negativo, com 6µl de lipofectamina. | 62 |
| Figura III. 4 - Tranfecção de células HEK 293T com o vetor pVAX1_6T' , e respetivos controlos, com 6µl de lipofectamina. | 63 |
| Figura III. 5 - Curva de crescimento, após indução com IPTG, da cultura de células <i>E. coli</i> expressando a proteína recombinante 6T' | 66 |
| Figura III. 6 - Figura III. 6 - SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> da proteína recombinante 6T' expressa em culturas de <i>E. coli</i> e detetada com anticorpos anti-His..... | 67 |

| | |
|---|----|
| Figura III. 7 - Mapa de restrição do vetor pQE30_6T' | 68 |
| Figura III. 8 - Confirmação da presença dos 6 antígenos na construção pQE30_6T', por eletroforese em gel de agarose, e após hidrólise com enzimas de restrição dos plasmídeos isolados dos clones de <i>E. coli</i> | 69 |
| Figura III. 9 – SDS-PAGE e <i>Western Blot</i> da proteína recombinante 6T' purificada detetada com anticorpos anti-His.. | 71 |
| Figura III. 10 – Resposta das subclasses de imunoglobulinas..... | 76 |
| Figura III. 11 – Razão IgG2a/IgG1. | 77 |
| Figura III. 12 – <i>Western Blot</i> da proteína recombinante 6T', 6T, 8T e de lisados de diferentes estirpes de <i>H. pylori</i> detetados com anticorpos anti- <i>H. pylori</i> 26695. | 79 |
| Figura III. 13 - SDS-PAGE após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e <i>Western Blot</i> da proteína recombinante 6T' e de lisados de diferentes estirpes detetados com anticorpos anti-6T' | 82 |
| Figura III. 14 - SDS-PAGE após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e <i>Western Blot</i> da proteína recombinante 6T' e de lisados de diferentes estirpes detetados com anticorpos anti-6T' | 85 |

LISTA DE TABELAS E EQUAÇÕES

| | |
|--|----|
| Equação II. 1 – Equação para calcular a quantidade de inserto DNA na reação de ligação..... | 37 |
| Tabela I. 1 - Resultados obtidos por meta-análise relativamente à sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico da <i>H. pylori</i> invasivos e não invasivos..... | 9 |
| Tabela II. 1 - Composição de 0,5l de meio SOC..... | 38 |
| Tabela II. 2 - Características das estirpes de <i>H. pylori</i> | 50 |
| Tabela II. 3 - Condições de cada grupo para a produção de soro | 52 |
| Tabela III. 1 – Quantificação do DNA plasmídico | 57 |
| Tabela III. 2 - Condições da reação de ligação, tipo de células competentes usadas na transformação e número de clones obtidos após inoculação das células transformadas em meio seletivo | 58 |
| Tabela III. 3 – Quantificação de DNA do fragmento constituído pelos seis antígenos..... | 64 |
| Tabela III. 4 – Concentração dos lisados proteicos das estirpes de <i>H. pylori</i> | 72 |
| Tabela III. 5 – Quantidade de antígeno em cada dose administrada aos murganhos | 73 |
| Tabela III. 6 – Títulos de IgG, IgG1 e IgG2 presentes no soro | 76 |
| Tabela III. 7 – Peso molecular das 6 proteínas alvo: CagA, VacA, UreB, HpaA, NapA e HomB. | 81 |

CAPÍTULO I – INTRODUÇÃO GERAL

A *Helicobacter pylori* é uma bactéria gram-negativa, microaerofílica, caracterizada por uma morfologia espiral e flagelada, que tem a aptidão em colonizar eficazmente o estômago do seu hospedeiro natural, o ser humano. Esta bactéria foi pela primeira vez isolada por Barry Marshall e Robin Warren, em 1982, a partir de biópsias obtidas de pacientes com úlceras e gastrites crônicas, tendo sido denominada inicialmente por *Campylobacter pylori* (Marshall & Warren, 1984).

A infecção pela *H. pylori* encontra-se associada ao aumento do risco de diversas doenças gástricas tais como gastrites agudas e crônicas, úlceras pépticas (UP) e duodenais (UD), cancro gástrico (CG) e linfoma associado à mucosa (MALT, do inglês *mucosa-associated lymphoid tissue*) (Cover & Blaser, 2009; Kusters *et al.*, 2006).

1. A INFECÇÃO POR *H. PYLORI*

Considera-se que a infecção por *H. pylori* ocorre na grande maioria durante a infância, nomeadamente até aos 10 anos de idade (revisto em Yvonne *et al.*, 2001). Alguns estudos realizados em crianças revelam que os principais fatores de risco compreendem o sexo masculino, o aumento da idade, estatura mais baixa, tabagismo, obesidade e baixo nível socioeconómico e educacional dos pais (revisto em Ford & Axon, 2010). São ainda considerados fatores de risco o consumo de álcool, a densidade populacional, as condições de higiene e o histórico familiar de doenças gástricas (Azevedo *et al.*, 2007; Brown, 2000; revisto em Yvonne *et al.*, 2001). Cerca de 50% da população mundial está infetada por esta bactéria, havendo uma maior incidência da infecção em países em desenvolvimento, podendo abranger 80% a 90% da população, enquanto que nos países desenvolvidos a população infetada ronda os 20% (Fig. I.1) (Frenck & Clemens, 2003).

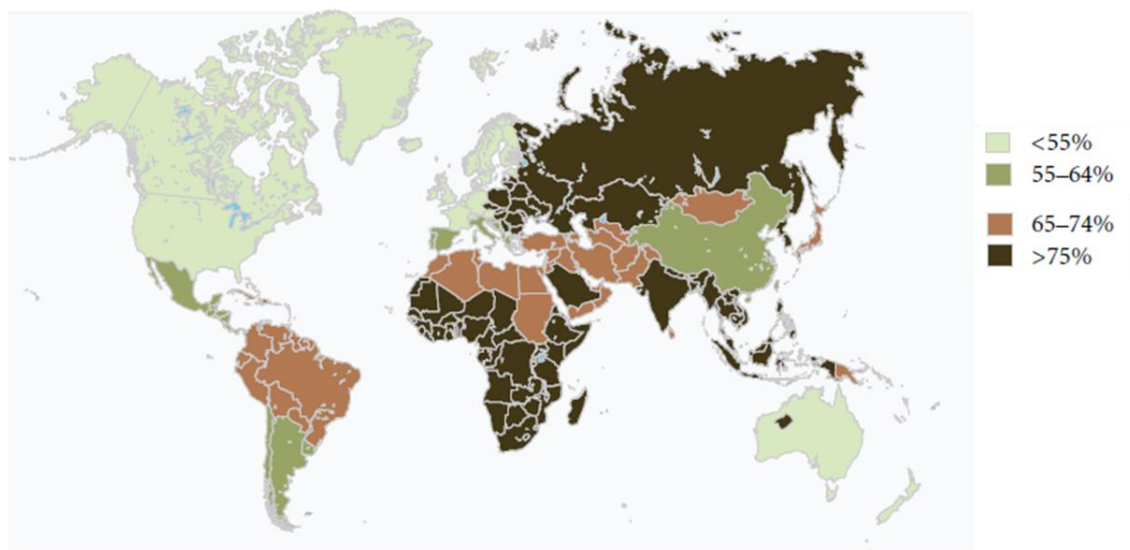


Figura I. 1 - Prevalência mundial da infecção por *H. pylori*. (Bauer & Meyer, 2011)

No que diz respeito ao processo de transmissão desta bactéria ainda existem incertezas. Têm sido propostas diversas vias de transmissão: oral-oral, fecal-oral, gastro-oral, amamentação, iatrogénica, e por vetores, nomeadamente comida, água e animais (Azevedo *et al.*, 2007; Brown, 2000; revisto em Yvonne *et al.*, 2001). Constatou-se ainda que esta bactéria sobrevive durante vários dias no leite, na água canalizada e na água dos rios (Brown, 2000). Apesar de o hospedeiro natural da *H. pylori* ser o homem esta também tem sido isolada de outros primatas e gatos domésticos (revisto em Brown, 2000). Existem também estudos epidemiológicos que indicam que a maior parte das infeções ocorre dentro da família, principalmente da mãe para os filhos e entre irmãos, devido à constante proximidade física (Azevedo *et al.*, 2007, 2009; Brown, 2000). No entanto as vias de transmissão propostas ainda são dotadas de diversas lacunas. Descobrir-se o processo concreto de transmissão desta infeção é essencial para a determinação de estratégias de controlo da propagação da infeção (Salysers & Whitt, 2002).

1.1 Estratégias de colonização

De uma forma geral a colonização do estômago por bactérias não é fácil, tendo em conta as condições adversas do ambiente gástrico, nomeadamente a acidez, os movimentos

peristálticos, a indisponibilidade de nutrientes e a atuação do sistema imunitário (SI) inato e adaptativo (Cover & Blaser, 2009). No entanto, a *H. pylori* possui uma elevada capacidade de adaptação a este ambiente intolerável pela maioria dos microrganismos.

A *H. pylori* possui diversos mecanismos e fatores de virulência que asseguram a sua sobrevivência, tais como enzimas, adesinas e a sua morfologia flagelar e espiral. A morfologia da *H. pylori* confere-lhe mobilidade e permite-lhe a penetração na mucosa gástrica e alcançar o epitélio gástrico (Figura I. 2 A) (Cover & Blaser, 2009). Ao longo do seu percurso até à mucosa a bactéria produz ainda duas enzimas, a mucinase e cologenase, que reduzem a viscosidade da mucosa, facilitando o seu movimento ao longo da mesma (Covacci & Rappuoli, 2003). Em resposta ao ambiente ácido encontrado, e de modo a assegurar a sua sobrevivência, a *H. pylori* expressa outra enzima, a urease, que catalisa a hidrólise de ureia em dióxido de carbono e amónia, promovendo assim a neutralização do pH na região que envolve a bactéria (Figura I. 2 B) (Cover & Blaser, 2009). Esta bactéria é ainda dotada de múltiplas adesinas, presentes à sua superfície, que têm a capacidade de se ligarem aos recetores das células epiteliais gástricas. A adesão da *H. pylori* ao epitélio gástrico permite que esta resista aos movimentos peristálticos e induza danos no tecido epitelial que levam à libertação de nutrientes por parte das células danificadas, para uso da bactéria (Cover & Blaser, 2009).

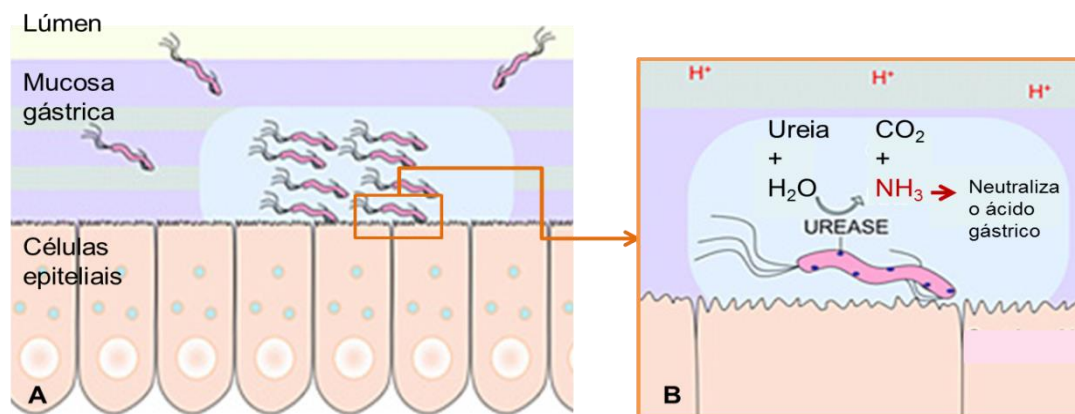


Figura I. 2 - Mecanismo de colonização da *H. pylori* na mucosa gástrica evidenciando a relevância da urease; A) Percurso executado pela *H. pylori* desde o lúmen do estômago até à sua aderência às células epiteliais na mucosa gástrica; **B)** A *H. pylori* expressa a proteína urease que catalisa a neutralização do ácido gástrico (H^+), através a hidrólise da ureia em CO_2 e NH_3 , permitindo assim a sobrevivência da bactéria. (Adaptado de: College of Public Health. *H. pylori* Transmission and Spread of Infection. Arizona. Disponível em: <http://publichealth.arizona.edu/outreach/health-literacy-awareness/hpylori/transmission>. Acesso: 26 de Fevereiro de 2013)

Sendo a erradicação natural da *H. pylori* uma circunstância rara e a sua infecção ser vitalícia, quando não tratada, poder-se-á supor que esta bactéria possui mecanismos de adaptação às condições e mudanças do meio gástrico (Kusters *et al.*, 2006). Um exemplo de adaptação da *H. pylori* às mudanças do meio envolvente é a alteração da expressão dos lipopolissacarídeos (LPS), que constituem fatores de virulência da *H. pylori* (Moran, 2007). Os LPS são habitualmente constituídos por lípidos A, um núcleo composto de oligossacáridos e uma cadeia lateral O (Kusters *et al.*, 2006). As estirpes de *H. pylori* isoladas clinicamente apresentam um fenótipo liso, ou seja, produzem LPS com um elevado peso molecular e com o antígeno O, enquanto que durante a cultura de estirpes *in vitro* a bactéria produz variantes de LPS sem a cadeia lateral O, expressando assim um fenótipo rugoso (Figura I. 3) (Moran *et al.*, 2002). A presença da cadeia lateral O permite à bactéria apresentar antígenos O que mimetizam os antígenos do sistema do grupo sanguíneo de Lewis, sendo esta também capaz de mimetizar outros antígenos do grupo sanguíneo (Monteiro *et al.*, 1998). Esta variação pode ser um dos mecanismos de adaptação da *H. pylori* às mudanças das condições do seu nicho (Moran *et al.*, 2002; Tannaes *et al.*, 2005). Esta bactéria é assim caracterizada por ter uma elevada capacidade de adaptação às defesas do hospedeiro e às mudanças do meio gástrico.

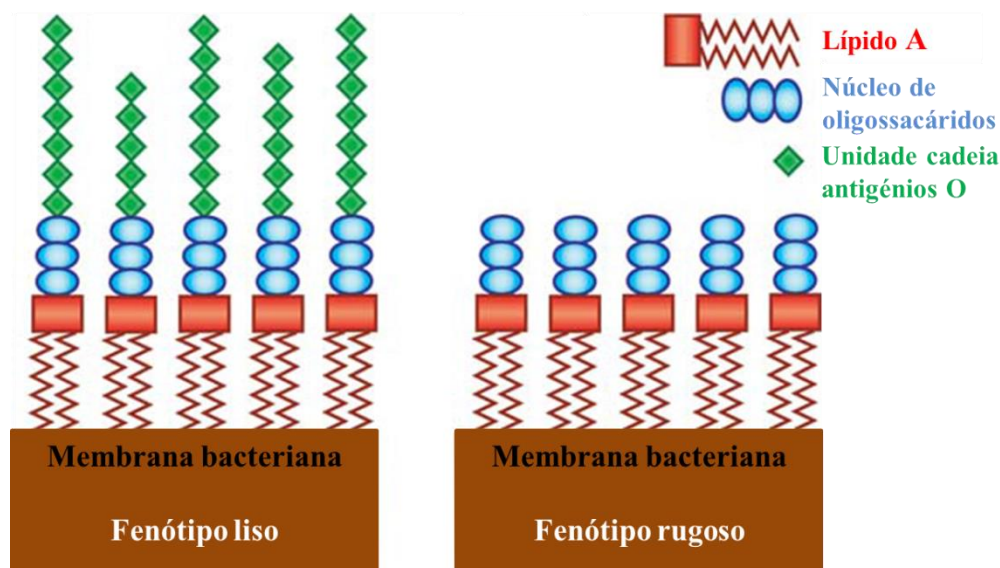


Figura I. 3 - Esquema da constituição da molécula LPS na *H. pylori*. O esquema à esquerda apresenta a constituição de uma molécula LPS com um fenótipo liso, constituída pelo lípido A ligado ao núcleo de oligossacáridos, sendo a região mais externa constituída por múltiplos sacáridos que formam a cadeia de antígenos O. O esquema à direita exibe a constituição de uma molécula LPS com um fenótipo rugoso, caracterizado pela carência de expressão da cadeia de antígenos O. (Adaptado de: Nilsson *et al.*, 2008)

Adicionalmente aos mecanismos de colonização descritos acima, a *H. pylori* estabelece ainda outros tipos de interações com as células epiteliais gástricas, mediadas por diversos fatores de virulência que estão associados à patogenicidade da bactéria bem como à constrição do SI adaptativo.

1.2 Patogenicidade

A colonização desta bactéria no estômago induz, em todos os indivíduos infetados, gastrite crónica (GC) mas no entanto nem todos desenvolvem sintomas clínicos. Estima-se que cerca de 80% a 90% dos indivíduos infetados têm uma GC assintomática, 10% a 15% desenvolvem UP ou duodenais e 1% a 2% desenvolvem CG (Kusters *et al.*, 2006). De facto, 70% dos cancros gástricos estão associados à infeção por *H. pylori* (Parkin, 2006). As diferentes manifestações clínicas têm por base a virulência da estirpe, as características do hospedeiro e os fatores ambientais (Cover & Blaser, 2009; Krah *et al.*, 2004; Kusters *et al.*, 2006). Tendo por base a associação desta bactéria ao desenvolvimento de carcinomas, a *H. pylori* foi classificada como cancerígena em 1994 pelo *World Health Organization's International Agency for Cancer Research* (IARC, 1994).

As diferentes reações do SI de cada hospedeiro e a elevada variabilidade genética desta bactéria levam então às diferentes manifestações clínicas observadas.

1.3 Variabilidade

Uma das particularidades associadas à *H. pylori* consiste na sua grande variabilidade genética. Em Dezembro de 2013 constavam 397 estirpes de *H. pylori* na base de genomas do NCBI, sendo no entanto estimável um número infinito de estirpes (Cooke *et al.*, 2005). A variabilidade genética tem por base a multiplicidade averiguada na dimensão do genoma, organização dos genes, tipo de genes e perfil alélico, conferindo às estirpes diferentes graus de patogenicidade (Cooke *et al.*, 2005). Para além disso, esta bactéria possui ainda a capacidade de

adquirir material genético de outras estirpes de *H. pylori*, bem como de espécies distintas que provisoriamente colonizem o estômago (Cooke *et al.*, 2005).

No entanto um dos grandes obstáculos à caracterização de todos os processos associados a esta bactéria é o facto de a sua variabilidade não se limitar ao nível genético. Condições tais como os fatores ambientais e as características particulares de cada indivíduo hospedeiro da *H. pylori* influenciam a interação entre o hospedeiro e a bactéria, bem como o efeito manifestado clinicamente pela infeção (Chui *et al.*, 2005). A população bacteriana de um indivíduo infetado apresenta também variabilidade. Um indivíduo pode ser infetado por diferentes estirpes, sendo que estas populações ao longo do tempo podem divergir como meio de adaptação às condições envolventes (Salama *et al.*, 2007).

Deste modo, torna-se complexo a caracterização exata e completa do mecanismo de infeção da *H. pylori*, uma vez que existe uma imensidão de fatores variáveis. Este tem sido um dos maiores obstáculos à obtenção de métodos de diagnóstico e de erradicação da bactéria com um grau de fiabilidade satisfatório, uma vez que as manifestações da infeção são particularizadas a cada paciente.

2. DIAGNÓSTICO DA INFEÇÃO POR *H. PYLORI*

Atualmente existem diversas técnicas possíveis para diagnosticar a presença de infeção pela *H. pylori*, podendo estas ser classificadas em métodos invasivos ou não invasivos, de acordo com a sua metodologia.

2.1 Métodos invasivos

Os métodos invasivos implicam a recolha de biópsias da mucosa gástrica, através de uma endoscopia gástrica (Leal *et al.*, 2011). A cultura, a histologia, o teste rápido da urease (RUT, do inglês *rapid urease test*) e os métodos de biologia molecular são exemplos de técnicas aplicadas a amostras obtidas de métodos invasivos.

A cultura consiste no isolamento da bactéria a partir de tecido infetado e da sua cultura em laboratório. No entanto esta técnica apresenta um procedimento laboratorial exigente não sendo por isso a técnica mais empregue.

A histologia é um dos métodos mais usados para o diagnóstico da *H. pylori*. Este diagnóstico consiste na análise direta de uma biópsia. A partir da análise consegue-se reconhecer a morfologia da *H. pylori* bem como avaliar as manifestações clínicas na infeção (Vaira *et al.*, 2002).

O RUT é uma técnica de diagnóstico pouco dispendiosa e com resultados rápidos. Este diagnóstico é baseado na atividade da enzima urease da *H. pylori*, que decompõe a ureia em amónia, levando a um aumento do pH que pode ser detetado pelo indicador fenol vermelho (Vaira *et al.*, 2002).

Os métodos moleculares são empregues não só para o diagnóstico da infeção mas também para analisar a diversidade, detetar fatores de virulência, averiguar a persistência e analisar os padrões de resistência da *H. pylori* a antibióticos, como a claritromicina (Cirak *et al.*, 2007; Mégraud & Lehours, 2007; Tonkic *et al.*, 2012). As técnicas de biologia molecular mais utilizadas são o PCR (do inglês *polymerase chain reaction*), PCR em tempo real e o FISH (do inglês *fluorescent in situ hybridization*) (Guarner *et al.*, 2010; Tonkic *et al.*, 2012). Apesar dos métodos biomoleculares serem considerados técnicas de diagnóstico invasivas atualmente encontra-se disponível um teste de diagnóstico não invasivo baseado em técnicas biomoleculares, nomeadamente o PCR em tempo real a fezes, que permite tanto a deteção da bactéria como testar a suscetibilidade desta à claritromicina (Tonkic *et al.*, 2012).

2.2 Métodos não invasivos

As técnicas de diagnóstico não invasivas são, por exemplo, o teste de sopro da urease (UBT, do inglês *urease breath test*), os testes serológicos e os testes de antígenos fecais.

O teste UBT é baseado na conversão da ureia em amónia e CO₂ como o RUT. No entanto neste teste não é necessário a recolha de uma biópsia. Neste teste o paciente ingere um líquido com ureia marcada com ¹³C e ¹⁴C e recolhem-se amostras de sopro do paciente que serão

posteriormente analisadas. Caso a bactéria esteja presente será detetado CO₂ isotópico nas amostras recolhidas (Vaira *et al.*, 2002)

O primeiro diagnóstico da infeção pela *H. pylori* através de fezes foi relatado por Kozak *et al.*, a partir da execução de um ELISA (do inglês *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*) às fezes, usando anticorpos policlonais (pAb) para detetar os antígenos da bactéria. O uso de pAb apresentava, no entanto, uma elevada variação de exatidão entre ensaios, constatando-se que o uso de anticorpos monoclonais (mAb) se encontrava associado a uma maior sensibilidade de diagnóstico (Guarner *et al.*, 2010; Tonkic *et al.*, 2012). Este tipo de diagnóstico é habitualmente executado ou por ELISA ou por imunocromatografia (Guarner *et al.*, 2010).

O diagnóstico por sorologia consiste na deteção de anticorpos característicos da infeção. Os primeiros antígenos que foram empregues neste tipo de diagnóstico consistiam num conjunto de células da *H. pylori* sonificadas, mas esta técnica apresentava limitações ao nível da sensibilidade e especificidade (Mégraud & Lehours, 2007). Este tipo de diagnóstico tem por base o teste de ELISA e um conjunto de antígenos, cuja composição exata se encontra patenteada. Habitualmente o tipo de anticorpos detetados neste diagnóstico é a imunoglobulina G (IgG) (Guarner *et al.*, 2010; Mégraud & Lehours, 2007). Mais recentemente surgiram novos testes serológicos baseados na deteção de outros anticorpos, tais como os anticorpos para a proteína CagA (do inglês *cytotoxin-associated antigen A*), VacA (do inglês *vacuolating cytotoxin A*) e para a subunidade B da urease (UreB) imobilizados em membranas de nitrocelulose (Cirak *et al.*, 2007). Porém o gene associado à proteína CagA não está presente em todas as estirpes e o gene vacA, apesar de estar presente em todas as estirpes, nem sempre é expresso. Por consequência estes testes serológicos poderão proporcionar a obtenção de um valor preditivo negativo reduzido.

2.3 Teste de diagnóstico ideal

Um teste de diagnóstico ideal para a infeção por *H. pylori* deve possuir os seguintes atributos: diagnóstico exato e preciso, sensibilidade e especificidade superior a 90%, valores preditivos positivos (VPP) e negativos (VPN) superiores a 90%, disponibilidade, resultados rápidos, económico, inofensivo e não deverá ser afetado prejudicialmente pela resposta imunológica (Meridian Bioscience, s.d.). A sensibilidade de um teste de diagnóstico indica a

probabilidade de um paciente com uma determinada doença ter um diagnóstico positivo para a doença enquanto a especificidade indica a probabilidade de um paciente sem a doença ter um diagnóstico negativo para a doença (Replogle *et al.*, 2009). O VPP define a probabilidade de um paciente com um diagnóstico positivo deter a doença enquanto o VPN ilustra a proporção de pacientes com um diagnóstico negativo que não têm a doença (Replogle *et al.*, 2009).

No entanto apesar de os diferentes métodos existentes para diagnosticar esta infeção terem gamas de sensibilidade e especificidade aceitáveis (Tabela 1.1), ainda não existe um teste de diagnóstico que seja considerado como método ideal, uma vez que todos possuem limitações e fatores que influenciam o seu desempenho.

Tabela I. 1 - Resultados obtidos por meta-análise relativamente à sensibilidade e especificidade de métodos de diagnóstico invasivos e não invasivos da *H. pylori* (Guarner *et al.*, 2010; Redéens *et al.*, 2011; Tonkic *et al.*, 2012; Vaira *et al.*, 2002)

| Método de diagnóstico | Sensibilidade (%) | Especificidade (%) |
|------------------------------|-------------------|--------------------|
| Métodos Invasivos | | |
| Cultura | 80-90 | 95-100 |
| Histologia | 83-95 | 90-100 |
| RUT | 80-95 | 90-100 |
| PCR | 96-100 | 94-100 |
| FISH | 92-94 | 100 |
| Métodos Não Invasivos | | |
| UBT | 81-100 | 80-98 |
| Serológicos (IgG/IgA) | 80-100 | 69-95 |
| Antígenos fecais | 93,2* | 93,2* |
| PCR em tempo real a fezes | 69* | 100* |

* Valor obtido a partir de um único estudo

A sensibilidade e a especificidade, na maioria dos testes de diagnóstico, são influenciadas pela perícia do técnico que executa o diagnóstico e o analisa. No caso de a biópsia não ser bem executada e de se obter uma baixa densidade de bactérias ocorrerá uma diminuição da sensibilidade ao nível dos testes de histologia, RUT, PCR e FISH, o que poderá resultar em falsos negativos (Tonkic *et al.*, 2012). É ainda reportada uma diminuição do desempenho do teste UBT no diagnóstico de crianças, uma vez que estas não conseguem soprar quantidades suficientes para se obterem resultados fidedignos (Leal *et al.*, 2011). Relativamente aos testes sorológicos, estes são caracterizados por induzirem falsos positivos, uma vez que o nível de

anticorpos persiste na corrente por longos períodos de tempo, mesmo após a erradicação da bactéria (Vaira *et al.*, 2002) e têm a limitação de não poderem ser empregues nem em crianças nem em adolescentes uma vez que a IgG nestes pacientes variam muito, influenciando assim a sensibilidade e especificidade do diagnóstico (Guarner *et al.*, 2010). Para além disso os testes sorológicos poderão também dar origem a resultados falsos negativos, uma vez que, devido à elevada variabilidade entre as diferentes estirpes, os anticorpos utilizados poderão não reconhecer a estipe em questão. Relativamente ao PCR em tempo real este tem a limitação de requerer equipamento dispendioso e o desempenho dos testes baseados em PCR dependem também dos *primers* escolhidos (Mégraud & Lehours, 2007; Tonkic *et al.*, 2012).

Surge então a necessidade de melhorar o desempenho dos testes de diagnósticos existentes, diminuindo a influência e condicionamento de diversos fatores nos resultados obtidos. Uma estratégia possível de adotar poderá consistir na seleção adequada de antígenos que potencializem o método sorológico.

3. ERRADICAÇÃO DA INFEÇÃO POR *H. PYLORI*

O facto de a *H. pylori* estar correlacionada com o desenvolvimento de diversas doenças leva a que pareça natural a decisão de a erradicar. No entanto ainda existem opiniões que o contradizem, afirmando que a preservação da infeção tem benefícios.

3.1 Erradicação: *benéfica ou prejudicial?*

Em 1999, Blaser sugeriu que a infeção por estirpes CagA positivas conferia ao hospedeiro imunidade a doenças tais como a doença de refluxo gastroesofágico (GERD, do inglês *Gastroesophageal reflux disease*), síndrome de Barret e adenocarcinomas da cárdia gástrica e do esófago inferior. No entanto, em 2011, Qian *et al.* compararam os resultados de 11 estudos e concluíram que não havia uma diferença significativa na frequência do GERD quando comparado com a persistência da infeção. Relativamente à síndrome de Barret, no estudo de

Wang *et al.* concluiu-se que não havia uma diferença significativa na incidência da infecção por *H. pylori* em pacientes com esôfago de Barret e os controles, pacientes saudáveis.

Chen e Blaser (2007, 2008) propuseram ainda a existência de diminuição de alergias e asma em crianças infetadas com estirpes de *H. pylori* CagA positivas, no entanto são necessários mais estudos para provar uma relação causal entre a erradicação da *H. pylori* em crianças e o desenvolvimento de asma (Hung & Wong, 2009).

O facto de em alguns estudos se observar taxas de incidência mais baixas de refluxo GERD e síndrome de Barret em pacientes infetados por *H. pylori* não é argumento suficiente para não erradicar a bactéria, uma vez que ainda não se determinou uma relação causal, ao contrário das doenças relacionadas com a infecção que foram descritas na seção I.1.2 (Sachs & Scott, 2012). Para além do mais, caso a erradicação da *H. pylori* leve ao refluxo ácido existem tratamentos para este (Sachs & Scott, 2012).

Existe então ainda controvérsias sobre se se deve erradicar a *H. pylori* em todos os casos ou apenas nos pacientes sintomáticos. No entanto, não existe controvérsia no que diz respeito às sequelas da infecção, ao contrário do que acontece relativamente aos efeitos da erradicação nas doenças apresentadas precedentemente.

3.2 Linhas de tratamento

O tratamento padrão empregue como primeira linha é a terapia tripla de fármacos. Esta terapia baseia-se na conjugação de um inibidor de bomba de prótons com dois antibióticos, usualmente a amoxicilina e a claritromicina, por um período de 14 dias (O'Connor *et al.*, 2013). Nos casos em que o paciente é alérgico à penicilina a amoxicilina é substituída por metronidazol e no caso de resistência à claritromicina esta é substituída por metronidazol (Graham & Fischbach, 2011; Wannamacher, 2011).

No entanto verifica-se que a primeira linha de ação pode falhar em 20% dos tratamentos, maioritariamente devido à resistência a antibióticos (Gisbert *et al.*, 2000, 2007). A excessiva aplicação de antibióticos como método terapêutico tem vindo a provocar o aumento da resistência dos microrganismos a antibióticos, levando a que haja uma queda na eficácia dos mesmos. A resistência à claritromicina, que varia de região para região, atinge em certos locais

valores superiores a 20% (Mégraud, 2004; Tonkic *et al.*, 2012; Wannamacher, 2011). Um estudo europeu verificou taxas de resistência de 17,5% para a claritromicina e 34,9% para o metronidazol (revisto em O'Connor *et al.*, 2013). Após 4 semanas de término do tratamento o paciente é submetido ao teste UBT com o intuito de se verificar se o tratamento foi eficaz na erradicação da bactéria.

Quando a primeira linha de tratamento falha na erradicação da bactéria é necessário sujeitar o paciente a outro tipo de terapia, variando pelo menos um dos antibióticos, uma vez que há uma maior probabilidade de a estirpe ter desenvolvido resistência aos antibióticos empregues na primeira linha de terapia. Como segunda linha de tratamento é aconselhado no documento de Maastrich-IV a terapia quadrupla contendo bismuto, terapia sequencial ou terapia tripla contendo levofloxacina, uma vez que o bismuto não se encontra disponível em todos os países (O'Connor *et al.*, 2013)*.

Aquando da falha da segunda linha de terapia é então efetuado um teste em que se avalia a atividade antimicrobial da estirpe em questão relativamente aos diferentes antibióticos. Após duas terapias com elevadas doses de antibióticos as estirpes vão desenvolvendo uma maior resistência a estes, diminuindo a possível taxa de sucesso de erradicação. Este teste de sensibilidade aos antibióticos deveria ser então efetuado antes de se realizar qualquer terapia, de modo a se fazer a escolha mais adequada para cada caso e aumentar assim a probabilidade de eficácia da terapia (Mégraud & Lehours, 2007). No entanto, por questões de custo, este tipo de testes de sensibilidade é apenas efetuado como último recurso (Wannamacher, 2011). Esta metodologia acaba por sujeitar o paciente a terapias com elevadas doses de antibiótico aumentando os problemas de resistência aos antibióticos. No entanto não é só a resistência a antibióticos que compromete a eficácia das terapias baseadas em antibióticos. Outros fatores que comprometem a eficácia das terapias são a falta de cumprimento da estratégia terapêutica por parte do paciente, os efeitos secundários associados, as elevadas taxas de recorrência da infeção e os elevados custos da terapia (Granham & Shiotoni, 2008).

* Referência para consultar informações complementares relativamente às diferentes terapias existentes.

3.3 Recorrência da infecção

O tratamento baseado em antibióticos tem a limitação de não prevenir a recorrência da infecção. A proporção anual de recorrência da *H. pylori* atinge valores superiores a 10% nos países em desenvolvimento, enquanto nos países desenvolvidos a proporção é inferior ($\approx 3\%$) (Niv, 2008). Esta situação torna-se problemática visto que após o primeiro tratamento de erradicação a eficácia da terapia com antibióticos decresce.

Tendo em conta a elevada prevalência da infecção pela *H. pylori* e o facto de esta estar associada a doenças gástricas graves, revela-se crucial o desenvolvimento de terapêuticas alternativas às atualmente existentes. É neste seguimento que tem vindo a surgir uma intensa pesquisa no que diz respeito ao desenvolvimento de vacinas terapêuticas e profiláticas como método alternativo ou complementar às terapêuticas existentes.

4. VACINAS CONTRA A *H. PYLORI*

Face às limitações evidenciadas da terapêutica com antibióticos revela-se essencial a conceção de uma vacina terapêutica e profilática. Estima-se que uma vacina profilática contra a *H. pylori* resulte numa elevada rentabilidade, mesmo com uma eficácia limitada de 55% (Rupnow *et al.*, 1999), pois a longo prazo preveniria o desenvolvimento de diversas doenças, nomeadamente os carcinomas gástricos.

As vacinas podem ser vacinas atenuadas (“vivas”), vacinas inativas (“mortas”), vacinas de subunidades, vacinas toxóides, vacinas conjugadas, vacinas de DNA (do inglês *deoxyribonucleic acid*) e vacinas de vetores recombinantes. Considerando que a resposta do sistema imune aquando de uma infecção normal se revela ineficaz na erradicação da *H. pylori* poder-se-á considerar desde já excluídas as vacinas vivas e atenuadas, visto que estas não seriam eficazes, tendo em conta que se iria obter uma resposta imunitária similar à conseguida na infecção natural.

Uma questão que se coloca, relativamente ao desenvolvimento de uma vacina eficaz contra a *H. pylori*, consiste na determinação dos mediadores de uma resposta do SI protetora e eficiente.

Sendo a *H. pylori* um agente patogénico maioritariamente extracelular, deveria desencadear uma resposta imunitária mediada pelos linfócitos T auxiliares do tipo 2 (Th2, do inglês *T helper type 2*) (Portal-Celhay & Perez-Perez, 2006). No entanto, constata-se um maior nível de interferão gama (IFN- γ) que de interleucina 4 (IL-4) na mucosa gástrica infetada, sugerindo que a resposta imunitária à infeção é mediada pelos linfócitos T auxiliares do tipo 1 (Th1, do inglês *T helper type 1*) (Bamford *et al.*, 1998). Esta resposta imunitária, característica de agentes patogénicos intracelulares, é uma evidência de que a *H. pylori* invade também células como as epiteliais gástricas (Petersen & Krogfelt, 2003). A existência de um reservatório intracelular da *H. pylori* poderá ser uma possível hipótese justificativa da persistência da infeção por esta bactéria (Terebiznik *et al.*, 2006). O facto de a resposta natural Th1 não ser efetiva na erradicação da bactéria e provocar o dano do tecido da mucosa gástrica levanta a questão de qual será o tipo de resposta que uma vacina deverá induzir, uma resposta humoral (mediada por células Th2) ou celular (mediada por células Th1). Existem estudos que sugerem que uma vacina deverá desencadear uma resposta Th2 (Aebischer *et al.*, 2001; Akhiani *et al.*, 2004; Ikewaki *et al.*, 2000) enquanto outros refutam que a resposta deve ser do tipo Th1 (Kamradt *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2005). Por outro lado, alguns estudos sugerem que ambos os tipos de respostas devem estar envolvidos na obtenção de uma imunidade protetora à infeção (Gottwein *et al.*, 2001).

Na conceção de uma vacina deve-se também ter em consideração a escolha de antígenos e a estratégia de imunização e de administração. Um dos grandes obstáculos à determinação de antígenos para uma vacina é a elevada variabilidade genética e fenotípica da *H. pylori*, bem como a falta de conhecimento crítico sobre as interações entre o hospedeiro e a bactéria. Os antígenos selecionados deverão ser identificados pelo SI do hospedeiro como “estranhos” e desencadear uma resposta imunitária com uma magnitude e duração suficiente para proporcionar a erradicação ou impedimento da colonização do agente patogénico (Chui *et al.*, 2005). Por outro lado, a estratégia de administração também influencia a resposta imunitária. No entanto, apesar da intensa investigação que tem sido realizada, ao nível da conceção de uma vacina contra esta bactéria, ainda não foi possível alcançar uma configuração que se revele eficaz na erradicação e/ou prevenção da colonização pela *H. pylori*.

Na última década têm sido testadas diversas vacinas anti-*H. pylori* em modelos animais, sendo os antígenos mais testados a UreB, a VacA e a CagA (Liu *et al.*, 2011; Zhao *et al.*, 2007;

Zhou *et al.*, 2009). No entanto, até agora, ainda nenhuma vacina testada em humanos promoveu uma proteção significativa, havendo apenas uma redução no número de bactérias (revisto em Every, 2013). Rossi *et al.* (2004) efetuaram um estudo em cães beagle e observaram que a vacinação com três antígenos recombinantes da *H. pylori*, nomeadamente a CagA, VacA e NAP, promoveu a diminuição da colonização da bactéria e constataram ainda que a imunidade contra a bactéria poderá ser mais eficaz através da utilização de diferentes antígenos, interferindo-se assim em diferentes aspetos da colonização e patogénese da infeção. Mais tarde, em 2008, Malfertheiner *et al.* efetuaram um estudo clínico em voluntários sem infeção para analisar a imunogenicidade e a segurança de uma vacina constituída pela VacA, CagA e NapA (do inglês *Neutrophil activating protein*), tendo-se observado que a vacina é bem tolerada e que gera uma resposta forte e específica do SI, tanto a nível do sistema celular como humoral do hospedeiro, promovendo a diferenciação de células T de memória específicas para os antígenos (revisto Koch *et al.*, 2013). Houve ainda um estudo, efetuado em modelos animais, em que se observou que a imunização com a UreB, HspA ou HpaA poderá proteger contra a persistência da infeção por *H. pylori* (Nystrom & Svennerholm, 2007). Atualmente não se encontra em comercialização nenhuma vacina contra a *H. pylori* a nível mundial.

É importante referir que a grande maioria dos ensaios têm sido realizados em modelos animais e com um número limitado de estirpes de uma dada área geográfica, e consequentemente os resultados podem não ser extrapoláveis para o caso de infeções reais. Para além de mais, o facto de os estudos serem efetuados em modelos animais suscita dúvidas relativamente à simulação da cinética da infeção e cronicidade, uma vez que o seu hospedeiro natural é o ser humano.

Constata-se então uma grande diversidade de obstáculos que têm impossibilitado a conceção de uma vacina mundialmente eficaz. Para ultrapassar os resultados insatisfatórios alcançados existem diversos aspetos que requerem aperfeiçoamento para aumentar a eficácia da vacina, nomeadamente a escolha ponderada de antígenos, o tipo de vacina, a estratégia de administração e o tipo de adjuvantes. Para se conseguir desenvolver uma vacina contra a *H. pylori* eficaz é importante que primordialmente se estabeleça o conjunto de antígenos que poderão potenciar a resposta imunitária e levar à eliminação da infeção (Every, 2013).

4.1 Seleção de antígenos para vacina anti-*H. pylori*

Na conceção de uma vacina, que não passe pelo uso do agente patogénico, é necessário a seleção dos antígenos que detenham um perfil que garanta a eficácia da vacina. A seleção estratégica de antígenos anti-*H. pylori* é um passo crucial para garantir a eficácia da vacina.

Segundo Ruggiero *et al.* (2003), a seleção de antígenos candidatos à conceção de uma vacina deve ter por base os seguintes critérios: expostos à superfície, abundantes, conservados entre as diferentes estirpes e ser um factor de virulência importante no processo de patogénese da infeção.

Para além dos critérios acima referidos surge um outro relevante: evitar a utilização de antígenos homólogos a antígenos do hospedeiro, tendo em conta que tal opção poderá levar ao desencadeamento de uma resposta auto-imune. Também não se deve optar por antígenos que tenham homologia com proteínas de outros microrganismos constituintes da flora microbiana normal do organismo humano, uma vez que tal poderá comprometer a especificidade do alvo da vacina, a *H. pylori*, e interferir no equilíbrio estabelecido entre o organismo e a flora microbiana natural. Uma opção para superar este problema de homologia poderá consistir na seleção de epítomos específicos da *H. pylori*, ou seja, determinantes antígenicos que não tenham homologia com a proteína equivalente de outros agentes ou do hospedeiro. No entanto tal processo é árduo, sendo que tem de se garantir que essa região selecionada é reconhecida pelo SI e que se encontra exposta à superfície na conformação nativa da proteína. Por outro lado, o direcionamento do SI acaba por ser para uma proteína inteira pelo que a seleção de epítomos específicos não elimina por completo o risco de resposta auto-imune.

O requisito de o antígeno se encontrar exposto à superfície tem por base permitir um fácil acesso e reconhecimento deste por parte do SI. Relativamente à abundância do antígeno este é um critério que deve ser analisado com cautela. Teoricamente, uma proteína que esteja presente em maiores concentrações deverá ser mais imunogénica (Ruggiero *et al.*, 2003), no entanto nem sempre tal acontece, como se observa no caso da urease. A urease é a proteína da *H. pylori* mais abundante, representando cerca de 5-10% do proteoma total da bactéria (Ruggiero *et al.*, 2003), no entanto esta nem sempre é detetada em estudos de imunoproteómica (IP) (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011), o que poderá indicar que esta proteína apresenta imuno-variabilidade, que poderá resultar de mutações na região de reconhecimento dos anticorpos. O facto de a proteína se encontrar em elevadas

concentrações poderá também levar a que o hospedeiro desenvolva tolerância a este antígeno, o que poderá sustentar a ausência de anticorpos específicos em circulação (revisto em Ruggiero *et al.*, 2003). No entanto se se selecionar uma proteína pouco abundante também se poderá diminuir a eficiência da imunização.

A concepção de uma vacina que se revele eficaz a nível mundial deve ter por base a seleção de antígenos conservados entre as estirpes, de modo a garantir que todas as estirpes são reconhecidas pelos anticorpos induzidos pela vacina. Uma vez que não existe um antígeno conservado entre todas as estirpes a abordagem ideal será uma vacina composta por diversos antígenos. Relativamente à necessidade de o antígeno ser um fator de virulência poderão surgir algumas discordâncias. Os fatores de virulência variam entre as estirpes, traduzindo-se em diferentes manifestações clínicas, ou seja, não são fatores conservados entre as estirpes e o objetivo de criar uma vacina é de que esta seja eficaz a nível global, e não apenas para as estirpes mais virulentas. No entanto os fatores de virulência geralmente estão implicados em mecanismos de sobrevivência da estirpe, pelo que ao desencadear-se uma resposta imunitária direcionada para estes fatores poder-se-á promover a erradicação indireta da bactéria.

4.2 Fatores de virulência

A severidade clínica de uma infeção por *H. pylori* é muito variável, sendo influenciada pela virulência associada à estirpe. A virulência das estirpes é associada à indução de alterações morfológicas, vacuolização e degeneração sucessiva de células (Kusters *et al.*, 2006).

Existe um conjunto de genes que são associados à virulência das estirpes, nomeadamente o gene *vacA*, a ilha de patogenicidade *cag* (*cag*-PAI, do inglês *cytotoxin associated gene Pathogenicity Island*) e fatores de aderência, nomeadamente proteínas da membrana externa (Bauer & Meyer, 2011; Prinz *et al.*, 2003).

Para além dos principais fatores de virulência referidos existem ainda diversas proteínas que interferem na colonização e persistência da infeção, como por exemplo a urease, as proteínas flagelares, as enzimas antioxidantes, a GroEL e a HpaA (do inglês *Helicobacter pylori adhesin A*).

4.2.1 VacA

O gene *vacA* encontra-se presente em todas as estirpes de *H. pylori* mas estima-se que apenas é expresso em cerca de 50-60% das estirpes (Lima & Rabenhorst, 2009; Müller *et al.*, 2002). Este gene contém duas regiões variáveis, a região sinal (s) e a média (m). Na região s os alelos podem ser do tipo s1 ou s2 e a região m pode ser do tipo m1 ou m2. A combinação s1/m1 é considerada mais virulenta que a combinação s1/m2, visto que provoca um maior dano nas células epiteliais devido a uma maior expressão do gene, levando à apoptose celular (Cover *et al.*, 2003). As restantes combinações alélicas são consideradas não tóxicas, uma vez que o gene não é expresso (Letley *et al.*, 2003).

A proteína VacA é uma citotoxina vacuolizante, excretada para o espaço extracelular, que contribui para a cronicidade da infeção (Bauer & Meyer, 2011). No entanto a VacA também se pode encontrar associada à membrana bacteriana e ser adquirida pelas células em contacto com a bactéria (Ilver *et al.*, 2004). O facto de esta proteína se encontrar no meio extracelular facilita o acesso do SI, podendo então esta ser considerada como um candidato à conceção de uma vacina. No entanto apenas esta proteína não permite que a vacina seja globalmente eficaz uma vez que nem sempre é expressa.

Esta proteína é caracterizada por executar múltiplas atividades celulares, nomeadamente a formação massiva de vacúolos citoplasmáticos nas células epiteliais, formação de canais membranares, apoptose celular, inflamação e modulação do SI, nomeadamente a supressão da proliferação de células T (Cover *et al.*, 2003; Lima & Rabenhorst, 2009; Tang *et al.*, 2008). Apesar de *in vitro* se verificar a organização massiva de vacúolos, que promovem a apoptose celular, tal fenómeno parece não ocorrer *in vivo* (Cover & Blanke, 2005; Kusters *et al.*, 2006). A formação de canais membranares nas células epiteliais induz a libertação de ureia e de aniões, aumentando a permeabilidade da membrana celular e levando assim à libertação de nutrientes e catiões (Montecucco & Berbard, 2003; Tombola *et al.*, 2001). Este mecanismo permite que as bactérias tenham à sua disposição nutrientes no meio extracelular.

No que diz respeito a manifestações clínicas da infeção, a presença desta proteína encontra-se associada ao desenvolvimento de UP e de CG (Cover & Blanke, 2005; Lima & Rabenhorst, 2009).

4.2.2 *Cag-PAI*

A *cag-PAI* consiste num conjunto de cerca de 32 genes, estando fortemente associada ao desenvolvimento de CG e de UP (Censini *et al.*, 1996; Every, 2013; Lima & Rabenhorst, 2009; Wen & Moss, 2009). Nos países Ocidentais estes genes encontram-se presentes em cerca de 60-70% das estirpes enquanto na Ásia constam em 95-100% das estirpes (Bauer & Meyer, 2011; Lima & Rabenhorst, 2009).

Nesta região genómica 18 dos genes expressam componentes do sistema de secreção do tipo IV, sendo alguns homólogos de outras bactéria, bem como genes que promovem o processo inflamatório, a partir do aumento de produção de citocinas e quimocinas, como a interleucina 8 (IL-8) (Argente *et al.*, 2008; Kusters *et al.*, 2006; Lima & Rabenhorst, 2009). Este sistema de secreção permite a penetração da proteína CagA, de peptidoglicanos e outros fatores bacterianos no citosol das células epiteliais gástrica (Argente *et al.*, 2008; Kusters *et al.*, 2006).

As estirpes de *H. pylori* que contêm a *cag-PAI* normalmente são também constituídas pelo alelo mais tóxico da VacA, nomeadamente o s1, enquanto as estirpes sem *cag-PAI* contêm geralmente o alelo não tóxico, o alelo s2 (Argente *et al.*, 2008).

Entre os diversos genes da *cag-PAI* o que se destaca mais pela sua virulência é o *cagA*.

A proteína expressa pelo gene *cagA* é uma das mais bem caracterizadas da *H. pylori* e encontra-se associada a uma maior frequência de desenvolvimento de gastrites atróficas, úlceras e CG, comparativamente a estirpes CagA negativas (Kusters *et al.*, 2006; Lima & Rabenhorst, 2009). Estima-se que o gene *cagA* se encontra presente em cerca de 50-70% das estirpes de *H. pylori* (Ching *et al.*, 1996; Cover *et al.*, 1995).

Com o auxílio do sistema de secreção do tipo IV, que cria canais membranares nas células epiteliais gástricas, a proteína CagA é injetada nas células. É no interior das células que esta proteína se torna ativa, mediante a sua fosforilação (Kusters *et al.*, 2006; Lima & Rabenhorst, 2009). Após ser ativada, a CagA interage com as moléculas de sinalização das células, desencadeando a proliferação celular anormal, procedimento este associado ao processo de carcinogénese, secreção da IL-8 e alterações morfológicas, nomeadamente a disrupção das junções celulares e rearranjo do citoesqueleto, levando a que a célula adquira um fenótipo designado “Colibri” (Figura I. 4) (Kusters *et al.*, 2006; Segal *et al.*, 1996, 1999; revisto em Yamaoka, 2010).

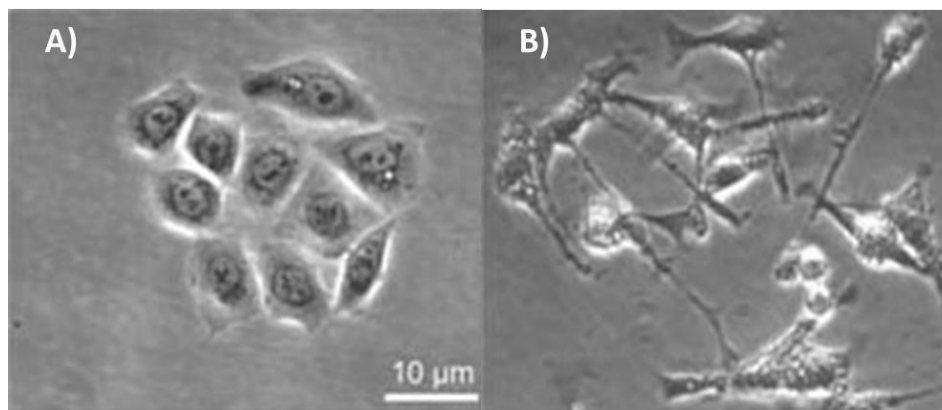


Figura I. 4 - Alteração do fenótipo das células epiteliais gástricas após infecção por estirpe *H. pylori* CagA positiva. A) Fenótipo das células sem infecção; B) Fenótipo “Colibri” após infecção. (Adaptado de: Tegmeyer *et al.*, 2011).

A CagA é considerada uma proteína intensamente imunogénica por diversos autores (Censini *et al.*, 1996; Covacci *et al.*, 1993; Lima & Rabenhorst, 2009). No entanto, esta proteína localiza-se no interior das células epiteliais do hospedeiro. Tal localização parece contradizer o facto de esta ser imunogénica, uma vez que se encontra inalcançável ao SI, no entanto esta tem sido também detetada na superfície de vesículas da membrana externa excretadas pela *H. pylori* (Olofsson *et al.*, 2010) e é também exposta ao SI quando ocorre a lise celular das células epiteliais gástricas. Por outro lado, ao analisar-se os resultados de diversos estudos de IP verifica-se que esta nem sempre é detetada, mesmo quando expressa (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011). Tal facto poderá ter por base mutações na região de reconhecimento dos anticorpos. O facto de esta proteína se localizar maioritariamente no ambiente intracelular sugere que a utilização deste antígeno, na conceção de uma vacina contra a *H. pylori*, poderá não desenvolver a resposta desejada, uma vez que os anticorpos anti-CagA poderão não conseguir alcançar a proteína. Assim sendo, uma vacina baseada apenas neste antígeno não será certamente eficaz na erradicação, mas a utilização desta em conjunto com mais antígenos poderá potencializar a eficácia da vacina.

Contrariamente à VacA, que induz a apoptose, a CagA é caracterizada por inibir a apoptose (Mimuro *et al.*, 2007). Surge então a proposição de estas duas proteínas terem função antagonistas. Tem sido observado que a CagA inibe a apoptose induzida pela VacA bem como a formação de vacúolos (Oldani *et al.*, 2009). Este fenómeno poderá justificar o facto de *in vitro* se verificar a formação de vacúolos mas não *in vivo*. Por outro lado, a VacA consegue inibir o alongamento celular que é mediado pela CagA (Argente *et al.*, 2008)

As estirpes podem ser classificadas em dois tipos de acordo com a presença/ausência das proteínas CagA e VacA. O tipo 1 corresponde a estirpes positivas para as duas proteínas e o tipo 2 para estirpes negativas para ambas (Prinz *et al.*, 2003). Nos países ocidentais, cerca de 70% dos pacientes infetados têm estirpes do tipo 1 (Prinz *et al.*, 2003). É ainda de salientar que as estirpes CagA positivas e VacA positivas do tipo s1 são detetadas com uma maior frequência em pacientes com UD, gastrites atróficas e adenocarcinomas gástricos (AG) (Prinz *et al.*, 2003), reforçando a associação destes dois fatores à virulência das estirpes.

4.2.3 Proteínas da membrana externa

Os fatores de aderência são considerados fatores de virulência uma vez que permitem a aderência da bactéria às células epiteliais, contribuindo assim para a colonização, manutenção e cronicidade da infecção pela *H. pylori* (Prinz *et al.*, 2001). Ao proporcionarem a aderência da bactéria às células epiteliais estes permitem que a bactéria possa libertar os seus produtos tóxicos das imediações das células, como a VacA, incorporar a CagA nas células bem como ter uma maior facilidade em aceder aos nutrientes (Maeda & Mentis, 2007; Prinz *et al.*, 2001). Estes fatores de aderência são proteínas da membrana externa (OMP, do inglês *outer membrane proteins*), mais especificamente adesinas que têm sido identificadas em estirpes virulentas (Prinz *et al.*, 2003).

Nem todas as bactérias *H. pylori* aderem às células epiteliais no processo de colonização. Estima-se que apenas 20% das bactérias presentes na mucosa gástrica aderem à superfície das células epiteliais (Necchi *et al.*, 2007). A expressão de adesinas é dotada de variabilidade entre as diferentes estirpes e até relativamente a uma única estirpe. Ao longo do tempo de colonização a *H. pylori* tem a capacidade de alterar a expressão das adesinas, como meio de se adaptar ao ambiente envolvente, por diferentes mecanismos, tais como conversão e duplicação de genes, variação alélica e ativação ou inativação da expressão do gene (Oleastro & Ménard, 2013; Solnick *et al.*, 2004).

Existe uma variedade de proteínas que se encontram expostas na superfície da *H. pylori* que cooperam e permitem que ocorra a aderência da bactéria às células epiteliais, no entanto a interferência na patogenicidade de cada adesina ainda não se encontra bem estabelecida (Maeda & Mentis, 2007). Alguns exemplos dessas proteínas são a BabA (do inglês *blood group antigen*

adhesin), a SabA, a OipA (do inglês *outer inflammatory protein*), a HomA e a HomB. (Bauer & Meyer, 2011; Kusters *et al.*, 2006; Lima & Rabenhorst, 2009).

Estas proteínas parecem ser reconhecidas pelo SI, podendo assim ser consideradas como potenciais candidatos a uma vacina, visto que a sua exposição à superfície torna-as acessíveis ao SI (Prinz *et al.*, 2003). No entanto, ao analisar-se os resultados de diversos estudos de IP não se observa a deteção relevante dos fatores de aderência indicados (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011). Estes resultados poderão ter por base as mutações e a capacidade de a *H. pylori* alterar a expressão das adesinas, podendo este ser também um mecanismo da bactéria em escapar à deteção pelo SI. Tendo também em conta o facto de que apenas 20% das bactérias aderem às células sugere estas proteínas nem sempre são expressas.

O gene *babA* é constituído por dois alelos, o *babA1* e o *babA2*, sendo que o *babA2* é associado ao desenvolvimento de UP e AG (Bauer & Meyer, 2011; Kusters *et al.*, 2006; Lima & Rabenhorst, 2009; Prinz *et al.*, 2003) e apenas este expressa uma adesina ativa (Kusters *et al.*, 2006). Estima-se que o alelo *bab2* esteja presente em cerca de 85% das estirpes (Bauer & Meyer, 2011).

A adesina BabA medeia a ligação ao grupo de antígenos fucosilados do grupo sanguíneo de Lewis b, que se encontram presentes nas células da mucosa gástrica (Ilver *et al.*, 1998; Kusters *et al.*, 2006).

Num estudo efetuado com estirpes obtidas de pacientes alemães observou-se que a presença dos genes *vacA* do tipo s1, da *cagA* e da *babA2* se encontravam significativamente associadas ao desenvolvimento de úlceras e de CG (Gerhard *et al.*, 1999), inculcando um aumento do risco de se desenvolver doenças gástricas (Argent *et al.*, 2008). Outro estudo realizado com estirpes de países ocidentais e de Ásia analisou a expressão da BabA, observando um dano do ambiente gástrico menor bem com uma menor concentração de bactérias *H. pylori* aquando da infeção por parte de estirpes que não expressam a BabA (Fujimoto *et al.*, 2007). Observaram ainda uma correlação entre a BabA activa e a presença de outros fatores de virulência, nomeadamente a *cagA* e a *vacA* do tipo s1 (Fujimoto *et al.*, 2007).

A SabA é uma OMP da *H. pylori* que medeia a ligação às glicoproteínas sialil-Lewis A e X que se encontram à superfície das células epiteliais gástricas humanas e está envolvida na ativação de neutrófilos (Kusters *et al.*, 2006; Lima & Rabenhorst, 2009; Mahdavi *et al.*, 2002). Estas glicoproteínas são encontradas maioritariamente quando o tecido gástrico está inflamado,

o que se verifica na infecção pela *H. pylori*, estando então a quantidade de SabA expressa diretamente relacionada com a dimensão da inflamação do tecido (Lima & Rabenhorst, 2009).

Durante o processo inflamatório nas imediações das células gástricas ocorre o dano celular e a aderência via adesina SabA que, para além de aumentar as respostas inflamatórias, permite um maior acesso aos nutrientes libertados pelas células danificadas (Kusters *et al.*, 2006).

Os granulócitos humanos possuem também antigénios sialilados na sua superfície, sendo então igualmente reconhecidos pela SabA. *In vitro* testou-se o efeito da ligação da SabA aos granulócitos, tendo-se verificado a inibição da opsonização, o que poderá levar a que a bactéria passe a controlar os granulócitos (Kusters *et al.*, 2006; Unemo *et al.*, 2005).

A aderência via SabA é então dependente da existência de inflamação e induz a expressão dos antigénios sialil-Lewis A e X (Mahdavi *et al.*, 2002). Como tal, esta proteína poderá não ser um ótimo candidato à conceção de uma vacina, uma vez a sua expressão não é constante e é dependente da intensidade da inflamação, sendo então influenciada pela estirpe e pelo SI do hospedeiro.

O gene *oipA* é um gene que nem sempre é funcional (Lima & Rabenhorst, 2009). Quando funcional, o gene expressa uma proteína OMP que é associada à indução da IL-8 na mucosa gástrica, à infiltração severa de neutrófilos e também funciona como um adesina (Kusters *et al.*, 2006, Lima & Rabenhorst, 2009, Shao *et al.*, 2005)

Ao analisar-se a presença da OipA para diferentes estirpes observou-se uma ligação entre a expressão do gene *oipA* e a ilha de patogenicidade *cag*, mais precisamente a expressão do gene *cagA*, sugerindo que a proteína CagA influencia a transcrição do gene *oipA* (Dossumbekova *et al.*, 2006; Kusters *et al.*, 2006; Shao *et al.*, 2005). Verifica-se ainda uma maior frequência da expressão da OipA em infeções de *H. pylori* que desenvolvem UD e CG (Kusters *et al.*, 2006)

Esta proteína está então associada a estirpes com uma maior virulência, nomeadamente *cagA* positivas, não sendo então expressa em todas as estirpes e sendo a sua expressão dependente da *cagA*. Deste modo esta proteína poderá não ser um candidato ideal a selecionar para a conceção de uma vacina.

A família mais pequena de OMPs é a família Hom, sendo constituída por 4 genes (Oleastro & Ménard, 2013). Os genes mais estudados desta família são o *homA* e *homB*, que codificam as proteínas HomA e HomB, respetivamente (Kang *et al.*, 2012; Oleastro & Ménard,

2013). A nível nucleotídico estes dois genes são 90% idênticos, confinando-se as diferenças à região mediana da ORF e encontram-se presentes em diferentes *loci*, o *locus* A e B, respetivamente (Kang *et al.*, 2012; Oleastro & Ménard, 2013). A presença e número de cópias destes genes pode variar de estirpe para estirpe, podendo estar presente uma única cópia de cada um, duas cópias só de um ou nenhuma dos dois (Kang *et al.*, 2012).

A proteína HomB é antigénica e encontra-se associada à promoção da secreção da IL-8 e contribui na aderência bacteriana, estando estas funções correlacionadas com o número de cópias do gene *homB* presentes (Kang *et al.*, 2012; Oleastro & Ménard, 2013). Esta proteína encontra-se associada ao desenvolvimento de UP em crianças e jovens Portugueses (revisto em Kang *et al.*, 2012) e CG, na presença do gene *cagA*, na população dos Estados Unidos da América e Colômbia, no entanto a sua função exata ainda não se encontra elucidada e parece ser influenciada pela origem geográfica da estirpe (Kang *et al.*, 2012; Oleastro & Ménard, 2013). No entanto este gene aparenta ser um marcador das estirpes de *H. pylori* mais virulentas, influenciando a severidade da doença associada à infeção (Kang *et al.*, 2012; Oleastro & Ménard, 2013). Apesar do conhecimento do envolvimento da HomB na aderência bacteriana ainda se encontra por determinar o recetor do hospedeiro para esta proteína (Oleastro & Ménard, 2013).

4.2.4 Urease

A urease representa cerca de 5-10% do proteoma da *H. pylori* e é constituída por duas subunidades, a UreA e a UreB (revisto em Kusters *et al.*, 2006). Esta é uma proteína essencial à sobrevivência da *H. pylori* perante as condições ácidas do estômago, sendo responsável pela hidrólise da ureia em amónia e CO₂, conferindo assim à bactéria resistência ao ácido gástrico e permite que esta mantenha o seu pH interno e periplasmático constante (revisto em Guo *et al.*, 2012; Prinz *et al.*, 2003). Para além de esta ser relevante na sobrevivência da bactéria no meio envolvente a amónia produzida por esta proteína induz efeitos citotóxicos nas células epiteliais gástricas, contribuindo assim para a patogenicidade da infeção (revisto em Kusters *et al.*, 2006).

Esta proteína encontra-se presente em todos os isolados clínicos, mas em diferentes concentrações, dependentemente da estirpe e das condições de crescimento (revisto em Kusters *et al.*, 2006). A urease localiza-se tanto no citoplasma como na superfície das células *H. pylori*,

estando em maiores quantidades no citoplasma (revisto em Kusters *et al.*, 2006 e Zhao *et al.*, 2007).

A urease tem sido usada em estudos de vacinas contra a *H. pylori* em modelos animais mas como antígeno imunogénico esta proteína, no seu estado nativo, não tem sido capaz de induzir a produção de uma resposta imune eficaz na inibição da atividade da urease (revisto em Zhao *et al.*, 2007). Tem-se ainda observado que os anticorpos policlonais específicos para a urease purificada suprimem o efeito de alguns anticorpos monoclonais contra a urease (revisto em Guo *et al.*, 2012). Estas observações sugerem que poderá haver dois tipos de anticorpos específicos para a urease, um que promove e outro que inibe a atividade enzimática (revisto em Guo *et al.*, 2012; Zhao *et al.*, 2007). Relativamente a esta proteína existe ainda muita controvérsia entre diferentes autores relativamente à sua imunogenicidade. Alguns autores consideram que apenas a UreB é imunogénica enquanto outros reportam que ambas as subunidades o são (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011).

Esta proteína poderá ser um potencial candidato para uma vacina, mas não na sua conformação nativa, e sim usando apenas epitopos desta proteína que proporcionem apenas a indução de anticorpos específicos inibidores da sua atividade enzimática.

4.2.5 Proteínas flagelares: FlaA e FlaB

A flagelina A (FlaA) é expressa pelo gene *flaA* e constitui maioritariamente o flagelo da *H. pylori* (Josenhans *et al.*, 1995). Esta proteína revela ser um componente crucial na motilidade da bactéria pela mucosa gástrica, sendo que bactérias mutadas no gene *flaA* apresentam um flagelo de menores dimensões e uma motilidade reduzida (Josenhans *et al.*, 1995).

A flagelina B (FlaB), codificada pelo gene *flaB*, também é um componente do flagelo da *H. pylori*, no entanto a mutação neste gene traduz-se apenas numa redução da motilidade (Josenhans *et al.*, 1995).

A seleção de antígenos específicos contra as flagelinas da *H. pylori* poderá ser uma boa abordagem para a conceção de uma vacina, inibindo a motilidade da bactéria (Vitoriano *et al.*, 2011). Ao analisar-se os resultados de diversos estudos de IP (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011) observa-se que estas duas flagelinas se revelaram

imunorreativas, maioritariamente a FlaA. No entanto nem a FlaA nem a FlaB se encontram expostas à superfície, dificultando assim o alcance dos anticorpos (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011). A presença de anticorpos específicos para estas flagelinas no soro de pacientes infetados pela *H. pylori* poderá ter por base o facto de estas flagelinas serem também componentes de vesículas da membrana externa (Mullaney *et al.*, 2009). As vesículas da membrana externa são vesículas produzidas por bactérias gram-negativas durante o crescimento bacteriano. Estas vesículas são continuamente libertadas na superfície da *H. pylori* e são observadas no interior das células epiteliais gástricas, podendo ser esta uma via de internalização de toxinas da *H. pylori* (Parker *et al.*, 2010).

4.2.6 Enzimas antioxidantes

As enzimas oxidantes têm sido consideradas alvos atrativos para a conceção de uma vacina contra a *H. pylori* por diversas razões, nomeadamente o facto de aumentarem a imunidade à *H. pylori* e as respostas imunes (Every, 2013). A seleção destes alvos enzimáticos, e por consequente destas vias enzimáticas, poderá ser uma estratégia para aumentar a capacidade de o hospedeiro eliminar a infeção (Every, 2013).

A superóxido dismutase e a tiolperoxidase têm sido apontadas como bons alvos, uma vez que são expressas à superfície da bactéria, aumentando assim o acesso do SI, e são essenciais à sobrevivência *in vivo* da bactéria (revisto em Every, 2013). Outras enzimas antioxidantes que também são apontadas como possíveis alvos na conceção de uma vacina contra a *H. pylori* são a catalase (KatA), a AhpC (do inglês Alkyl hydroperoxide detoxification) e a NapA.

A KatA é uma enzima caracterizada por decompor o peróxido de hidrogénio em água e oxigénio. Esta proteína confere então à *H. pylori* uma maior resistência ao *stress* oxidativo. Esta proteína encontra-se maioritariamente no citosol da *H. pylori*, no entanto também pode aparecer à superfície da bactéria como no espaço periplasmático (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011).

Segundo estudos com estirpes mutadas no gene que codifica a KatA esta enzima parece ter um papel crucial na persistência da infeção, não sendo essencial no processo inicial de colonização, o que poderá estar relacionado com o aumento do *stress* oxidativo ao longo da infeção (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011).

Com base nos resultados de diferentes estudos de IP, esta enzima parece ser um bom candidato à concepção de uma vacina (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011). No entanto esta enzima tem homologia com catalases de outros microrganismos presentes no ser humano, nomeadamente 64,9% de homologia com o *Bordetella pertussis*, 59,8% com o *Bacteroides fragilis* e 57,9% com o *Haemophilus influenzae* (Odenbreit *et al.*, 1996), o que poderá interferir na eficácia da vacina. Para evitar os problemas associados à homologia pode-se escolher epítomos específicos e não homólogos, no entanto o SI será direcionado para uma proteína com regiões com homologia. Este problema faz com que este antigénio não seja um bom candidato para uma vacina, no entanto poderá ser um bom candidato para diagnóstico.

A AhpC é codificada pelo gene funcional *ahpC* e pertence à família peroxiredoxina (Huang *et al.*, 2011). Como proteína antioxidante esta proteína tem a competência de decompor o peróxido de hidrogénio em peróxidos orgânicos, inibindo assim a peroxidação lipídica da *H. pylori* bem como o dano do seu DNA (revisto em Huang *et al.*, 2011 e O’Riordan *et al.*, 2012).

Esta proteína é encontrada maioritariamente à superfície da bactéria, tendo a capacidade de se ligar à mucina, um dos compostos do muco gástrico (revisto em Huang *et al.*, 2011 e Vitoriano *et al.*, 2011). No entanto, quando a *H. pylori* é exposta a um ambiente de *stress* oxidativo a AhpC passa a encontrar-se concentrada no citosol bacteriano (Huang *et al.*, 2011). No citosol bacteriano a AhpC adquire a funcionalidade de uma chaperona molecular, formando um complexo de elevado peso molecular (Huang *et al.*, 2011; revisto em O’Riordan *et al.*, 2012).

A AhpC permite então a que a bactéria resista aos danos proporcionados pelo *stress* oxidativo. Testes *in vitro* indicaram que a presença desta proteína é essencial para o crescimento da *H. pylori* e os resultados *in vivo* sugerem que esta proteína é crucial para a colonização da *H. pylori*, uma vez que estirpes mutadas no gene *ahpC* não apresentam capacidade de colonizar murganhos usados como modelo da infeção (revisto em O’Riordan *et al.*, 2012 e Vitoriano *et al.*, 2011)

Segundo a literatura esta proteína é abundante, imunogénica e conservada entre as diferentes estirpes de *H. pylori* (revisto em Huang *et al.*, 2011 e O’Riordan *et al.*, 2012). Em diversos estudos de IP verificou-se que esta proteína é imunogénica, no entanto esta nem sempre é detetada no imunoproteoma (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011). Tal observação sugere que esta proteína apresenta elevada variabilidade.

As propriedades da AhpC apresentadas fazem desta proteína um potencial candidato para uma vacina, de modo a proporcionar à bactéria um ambiente envolvente inadequado à sua sobrevivência. No entanto surge um problema relativo a esta proteína, nomeadamente a sua homologia com proteínas humanas. A AhpC é filogeneticamente mais próxima dos genes Prx humanos que dos outros homólogos (Chuang *et al.*, 2006; revisto em Vitoriano *et al.*, 2011), o que poderá ser problemático na conceção de uma vacina, devido ao desencadeamento de autoimunidade.

A NapA é uma proteína que induz o recrutamento de neutrófilos e de monócitos para a mucosa gástrica infetada, bem como a produção de IL-8, induzindo assim a inflamação na mucosa gástrica (Koutouras *et al.*, 2012; Ruggiero *et al.*, 2003). Esta proteína tem então um papel crucial no desencadeamento e manutenção da resposta inflamatória na mucosa gástrica (Koutouras *et al.*, 2012). A NapA tem ainda a capacidade de se ligar a hidratos de carbono, mediando assim a ligação da *H. pylori* às células da mucosa gástrica, e de estimular a produção de intermediários reativos de oxigénio (Wang *et al.*, 2006).

A *H. pylori* expressa uma elevada quantidade da proteína NapA, sendo esta considerada um dos maiores antígenos da *H. pylori* (revisto em Wang *et al.*, 2006 e Vitorino *et al.*, 2011), estando esta localizada tanto à superfície da membrana externa da *H. pylori* como no citoplasma (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011). No entanto em estudos de IP esta proteína não revela uma elevada frequência de imunoreatividade (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011).

No estudo de Wang *et al.* (2006) analisou-se a colonização de estirpes mutadas no gene napA, verificando-se uma diminuição da habilidade da *H. pylori* colonizar o estômago, comparativamente às estirpes sem mutação no mesmo gene. Esta proteína poderá então ser um bom candidato para a conceção de uma vacina mas certamente não será efetivo como único componente antigénico da vacina, tendo em conta os resultados dos estudos de IP, que poderão ter por base mutações associadas a esta proteína (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011).

4.2.7 GroEL

A GroEL pertence à família de proteínas de choque térmico e encontra-se localizada tanto no citosol da *H. pylori* como à sua superfície (Krah *et al.*, 2004). No citosol esta tem a funcionalidade de uma chaperona e quando é adsorvida para a membrana exterior da *H. pylori* esta funciona como chaperona da urease e como adesina. Esta proteína induz a produção de citocinas pro-inflamatórias (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011), tendo então um papel ativo na indução de inflamação na mucosa gástrica.

Esta família de proteínas encontra-se fortemente conservada tanto em células procariotas como eucariotas e são habitualmente imunorreativas (Tanabe *et al.*, 2003; revisto em Vitoriano *et al.*, 2011). A *Escherichia coli* e a *Campylobacter rectus* são exemplos de bactérias com proteínas homólogas à GroEL e que infetam o ser humano (Tanabe *et al.*, 2003; Vitoriano *et al.*, 2011). O facto de esta proteína não ser específica da *H. pylori* cria problemas de reatividade cruzada, como é possível verificar nos resultados de diversos estudos de IP (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011), em que a GroEL é detetada em pacientes sem infeção pela *H. pylori*. O facto de poder haver reatividade com proteínas humanas homólogas da GroEL levanta sérios problemas relativamente ao uso desta proteína como antigénio na conceção de uma vacina, havendo o risco de se desenvolverem doenças autoimunes.

Esta proteína aparenta estar mais intimamente relacionada com estirpes que estão associadas ao desenvolvimento de CG (Krah *et al.*, 2004; Vitoriano *et al.*, 2011), podendo então ser considerado maioritariamente como um biomarcador de estirpes mais virulentas, que levam ao desenvolvimento de CG, e não um biomarcador da infeção. Tendo em conta as limitações de incluir este antigénio numa vacina contra a *H. pylori*, este parece ser um antigénio a evitar.

4.2.8 HpaA

A HpaA é uma lipoproteína localizada à superfície da *H. pylori* (revisto em Flach *et al.*, 2011). A funcionalidade desta proteína ainda não se encontra bem relatada. Esta proteína tem sido descrita como um fator de aderência às células sanguíneas (revisto em Volland *et al.*, 2003).

No entanto, em estudo *in vitro* observou-se que a HpaA medeia a ligação ao ácido siálico e tem também sido caracterizada como uma proteína flagelar (revisto em Volland *et al.*, 2003). Por outro lado, esta proteína é considerada um fator indispensável na colonização da *H. pylori* em modelos animais, induzindo uma diminuição da resposta do SI (revisto em Flach *et al.*, 2011).

Esta proteína encontra-se conservada entre todas as *H. pylori* isoladas de pacientes e apresenta uma homologia reduzida com outras proteínas, sendo então considerada uma proteína específica da *H. pylori* (revisto em Flach *et al.*, 2011 e Carlsohn *et al.*, 2006).

A HpaA tem então o potencial de ser um candidato para uma vacina contra a *H. pylori*, tendo-se apresentado como imunogénica em estudos em modelos animais (revisto em Flach *et al.*, 2011). No entanto, pela análise de resultados de diferentes estudos de IP observou-se que a HpaA tem imunovariabilidade, (Haas *et al.*, 2002; Kimmel *et al.*, 2000; Mini *et al.*, 2006; Vitoriano *et al.*, 2011), o que sugere que esta proteína, apesar de se encontrar expressa em todas as estirpes poderá possuir uma variância genética elevada na região de reconhecimento do SI.

4.3 Vacina multi-antigénica

A conceção de uma vacina multi-antigénica para a *H. pylori* aparenta ser a abordagem com maior potencial. Não existe um antígeno específico para a *H. pylori* que se encontre conservado entre as estirpes. Deste modo, a combinação de diversos antígenos poderá ser o melhor método para garantir que a vacina é mundialmente eficaz na erradicação da *H. pylori*. Quanto maior for o conjunto de antígenos provavelmente maior será a potencialidade da vacina. No entanto há que ter em consideração os parâmetros apresentados anteriormente para a escolha de antígenos, pois a escolha incorreta de antígenos também poderá condicionar os fins obtidos.

No entanto, a utilização de múltiplos antígenos tem limitações. O processo de purificação de uma única proteína é um processo árduo e dispendioso. Deste modo a conceção de vacinas com um conjunto de proteínas teria um custo demasiado elevado para comercialização. É neste âmbito que surge como uma boa alternativa a utilização de epítomos das proteínas ao invés da utilização da proteína na sua totalidade.

Na conceção de uma vacina o uso de epítomos tem diversos benefícios: aumento da segurança da vacina, melhor potência e amplitude a partir de uma ordenação racional dos epítomos e focagem da resposta do SI em epítomos conservados (revisto em Yang *et al.*, 2013 e Zhou *et al.*, 2009). Os epítomos permitem uma melhor segurança da vacina uma vez que por vezes a proteína nativa possui epítomos reconhecidos pelo SI que desencadeiam efeitos secundários indesejados (Guo *et al.*, 2013). Deste modo, a seleção cuidada de epítomos permite evitar esses efeitos. No entanto o uso de epítomos também tem associado limitações. Os epítomos, devido ao seu baixo peso molecular, têm uma baixa imunogenicidade (Guo *et al.*, 2012). Para ultrapassar esta limitação é usual conjugar os epítomos a adjuvantes e/ou aumentar a dimensão dos epítomos (Guo *et al.*, 2012).

A escolha de antígenos tem de ser um processo ponderado de modo a garantir que o epítomo desencadeia o efeito desejado. Ao seleccionar-se os epítomos tem de se garantir que estes se encontram expostos na conformação nativa da proteína, de modo a que o SI consiga alcançá-los. A análise da exposição dos epítomos poderá ser procedida recorrendo a programas de bioinformática, que permitem a visualização da conformação nativa da proteína e identificar a localização de determinadas sequências, como por exemplo o programa *Cn3D*. Outros aspetos que se deverá ter em consideração na escolha de epítomos são a sua imunogenicidade e conservação entre as diferentes estirpes. A determinação da conservação poderá ser efetuada por métodos bioinformáticos, que permitem fazer uma previsão das regiões que estão sujeitas a uma maior taxa de mutação. Deste modo, poderá ser possível prever quais os epítomos mais conservados. Outro método possível para seleccionar epítomos poderá consistir em construir vários péptidos de cada proteína e incubá-los com o soro de diferentes pacientes infetados, determinando assim qual a região que é mais conservada e imunogénica, como foi efetuado por Yang *et al.* (2013) relativamente à UreB.

5. OBJETIVOS E ESTRATÉGIAS DO TRABALHO

O facto de a *H. pylori* abranger uma grande proporção da população mundial e estar associada a manifestações clínicas graves torna fulcral o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas. No entanto, a elevada variabilidade genética associada a esta bactéria tem limitado a eficácia das vacinas propostas. Com o intuito de ultrapassar esta limitação, o principal objetivo deste trabalho consistiu no melhoramento de uma vacina multi-antigénica anti-*H.*

pylori e analisar se os anticorpos gerados em murganhos imunizados com estas construções reconhecem estirpes de *H. pylori* obtidas de pacientes de locais geográficos muito diferentes.

Em primeiro procedeu-se à modificação de uma vacina multi-antigénica previamente elaborada no laboratório de Engenharia Biomédica da FEUCP, baseada num plasmídeo eucariota pVAX (Invitrogen) e denominada por pVAX1_6T, sendo esta constituída por epítomos de proteínas da *H. pylori*. A modificação da vacina consistiu na substituição do epítomo do gene groEL pelo epítomo do gene napA, passando a nova construção a ser designada de pVAX1_6T'. Posteriormente o DNA recombinante, composto pelos 6 epítomos, foi transferido para o vetor procariota pQE30, sendo designado por pQE30_6T'.

Numa segunda fase procedeu-se à produção de soro anti-*H. pylori* e anti-6T' em murganhos. O soro produzido foi utilizado em análises de *Western Blot* de forma a avaliar o reconhecimento de proteínas de sonicados de diversas estirpes de *H. pylori* obtidas de locais geográficos muito diferentes. Esta análise teve como objetivo avaliar se os anticorpos produzidos com os candidatos a vacinas reconheciam estipes representativas dos vários continentes.

CAPÍTULO II – MATERIAIS E MÉTODOS

1. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINADOS

A produção dos candidatos a vacinas teve por base a construção dos plasmídeos recombinados pVAX1_6T' e pQE30_6T', os quais constituem vetores de expressão para células eucariotas e procariotas, respetivamente.

1.1 *pVAX1_6T'*

A construção do plasmídeo pVAX1_6T' teve por base a alteração da construção pVAX1_6T elaborada previamente no laboratório de Engenharia Biomédica da FEUCP.

O pVAX1_6T é constituído por fragmentos de 6 antígenos da *H. pylori*, nomeadamente da CagA, VacA, HpaA, UreB, HomB e GroEL e tem o gene de resistência à canamicina (Figura II. 1).

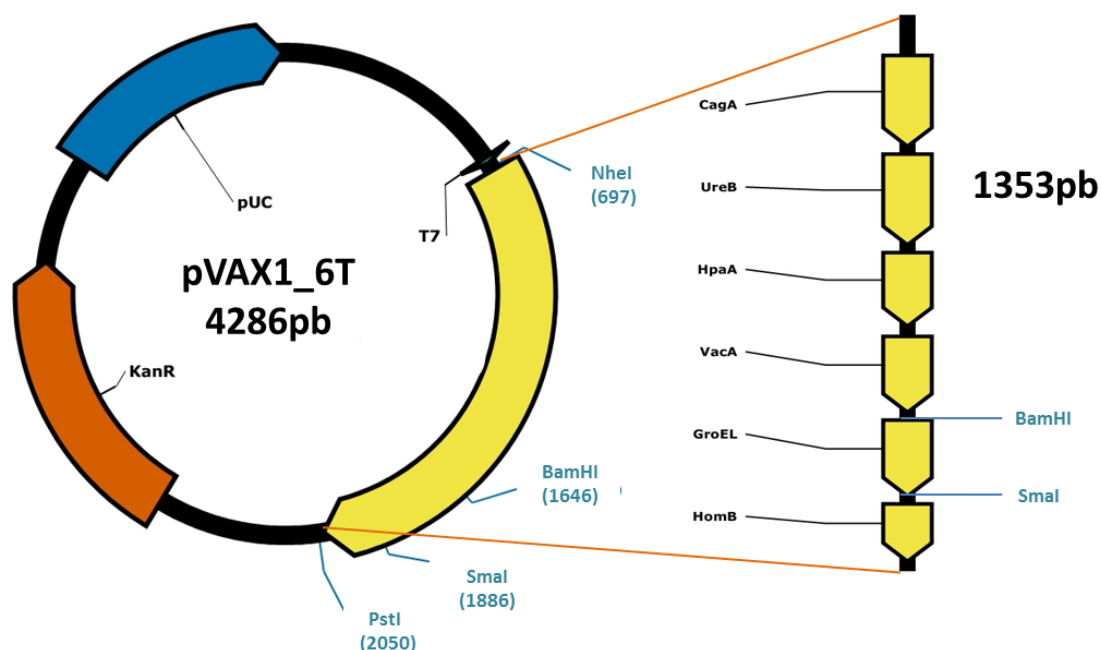


Figura II. 1 - Mapa de restrição do plasmídeo pVAX1_6T. Na representação esquemática estão discriminados alguns constituintes do plasmídeo, tais como o gene de resistência à canamicina (KanR), a origem de replicação (pUC), o local de iniciação/promotor (T7) e os antígenos da *H. pylori*. Os antígenos são delimitados pelas enzimas de restrição NheI e PstI. Na imagem à direita estão ilustrados os constituintes e a ordenação dos epítomos, bem como as enzimas de restrição que limitam o epítopo da GroEL, nomeadamente a BamHI e SmaI. (pb: pares de base). (Adaptado de imagens obtidas pelo *software* PlasmaDNA).

A diferença do plasmídeo pVAX1_6T' é que, ao invés do fragmento correspondente à GroEL, tem um fragmento correspondente a um epítopo da napA da *H. pylori*. O epítopo napA que se considerou para a construção do pVAX1_6T' foi sintetizado pela empresa NZYTECH e clonado no vetor pUC57 (ver em anexo sequência genética e respetiva proteína do epítopo NapA). O gene napA no vetor pUC57 (pUC57_napA) tem como enzimas de restrição a SmaI e a BamHI (Figura II. 2).

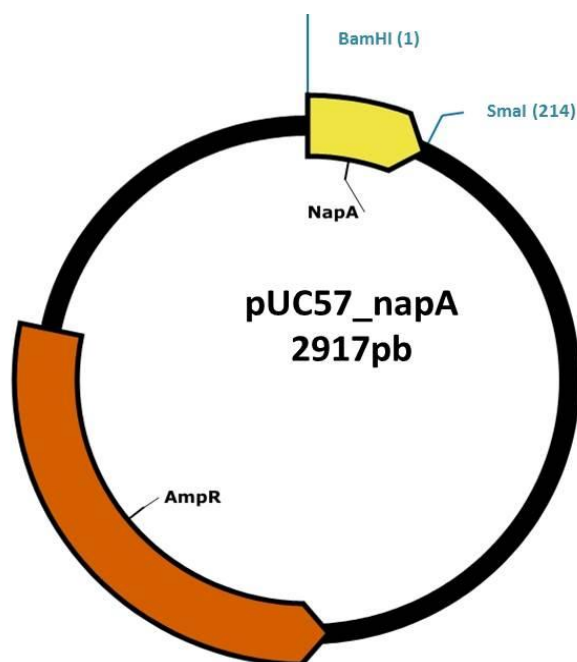


Figura II. 2 – Representação esquemática do pUC57_napA. Na imagem é ilustrado a localização do gene de resistência à ampicilina (AmpR) e o epítipo do gene napA, sendo este delimitado pelas enzimas de restrição BamHI e SmaI. (pb: pares de base). (Adaptado de imagens obtidas pelo *software* PlasmaDNA)

1.1.1 Isolamento dos fragmentos de interesse

Procedeu-se à transformação de células competentes de *Escherichia coli* NZY5a (NZYTech, Lisboa, Portugal) preparadas com os plasmídeos pVAX1_6T e pUC57_napA, como é descrito na seção II.1.3. As células transformadas com o pVAX1_6T e pUC57_napA foram plaqueadas em placas de *petri* com meio LB-agar sólido suplementadas com canamicina e ampicilina, respetivamente.

Finalizado o processo de transformação de células competentes selecionaram-se clones positivos para preparar um banco de células. Cresceu-se os clones do pVAX1_6T e do pUC57_napA em meio LB (Luria-Bertani) (Sigma-Aldrich, St Louis, MO, Estados Unidos da América (EUA)) suplementado com canamicina (50µg/ml) e ampicilina (50µg/ml), respetivamente, de acordo com os procedimentos descritos na seção II.1.4. As células foram conservadas com 20% de glicerol a -80°C. Todas as produções de plasmídeos foram obtidas do mesmo banco de células.

Em seguida procedeu-se à produção e extração do DNA plasmídico dos dois plasmídeos de acordo com o procedimento descrito na seção II.1.4.

Para isolar os fragmentos de interesse foi necessário hidrolisar o pVAX1_6T e o pUC57_napA com as enzimas *FastDigest SmaI* e *FastDigest BamHI* (Thermo Fisher Scientific, Lisboa, Portugal). A enzima SmaI origina extremidades cegas e a BamHI extremidades coesivas (Figura II.3). As sequências de reconhecimento destas enzimas permitem então excluir o epítipo da GroEL do pVAX1_6T e obter o fragmento de napA isolado do vetor pUC57_napA (rever figura II.1 e II.2).

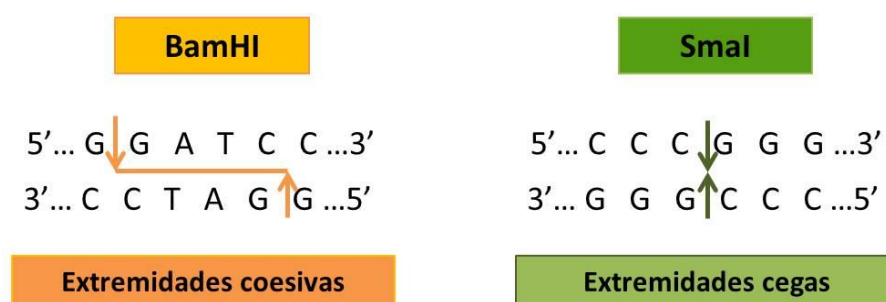


Figura II. 3 – Locais de hidrólise e respetivas extremidades originadas pela ação das enzimas BamHI e SmaI.

A constituição da mistura reacional teve por base as concentrações recomendadas pelo fabricante das enzimas, tendo-se optado por usar o tampão *10X FastDigest Green Buffer* (Thermo Fisher Scientific). A reação ocorreu por incubação a 37°C por 30 minutos e posteriormente a 80°C por 5 minutos com o intuito de inativar as enzimas.

Posteriormente os fragmentos foram separados por eletroforese, segundo os procedimentos descritos na seção II.1.6 e extraiu-se e purificou-se as bandas de interesse, segundo o protocolo indicado na seção II.1.7.

1.1.2 Otimização das condições de ligação do fragmento NAP ao plasmídeo pVAX1

Os fragmentos de DNA plasmídico recuperados foram submetido a uma reação de ligação, nomeadamente à inserção do inserto de DNA (napA) no vetor (pVAX1_6T sem GroEL). Para tal utilizou-se a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific). A mistura

reacional teve por base as indicações do fabricante da ligase. Uma vez que os fragmentos a ligar têm uma das extremidades cega a ligação não é muito eficiente, pois as extremidades dos dois fragmentos precisam de estar simultaneamente próximas. Deste modo usou-se na mistura reacional uma solução de 50% (p/v) polietilenoglicol (PEG) 4000 (Thermo Fisher Scientific), para potencializar a reação de ligação, uma vez que torna a mistura mais viscosa e limita o movimento das moléculas.

Na preparação da mistura reacional foram testadas diferentes quantidades de inserto. Para o vetor testou-se 45ng. Relativamente ao inserto experimentou-se diferentes razões molares (vetor:inserto), nomeadamente de 1:24, 1:25, 1:48 e 1:50. Apesar de o fabricante aconselhar uma razão de 1:1 ou de 1:5 foram testadas razões muito superiores para potenciar a reação, uma vez que o inserto tem uma extremidade cega e tem diminutas dimensões comparativamente ao vetor, nomeadamente de 213pb. A determinação da quantidade de inserto a adicionar foi calculada de acordo com a Equação II.1. Sempre que necessário executou-se o protocolo de purificação direta de produtos de PCR com o kit *NZYGelpure* (NZYTech), para concentrar os fragmentos da napA, de modo a ser possível obter uma mistura reacional concentrada em 20µl. Para a ligação dos fragmentos usou-se ainda 2µl de 50% (p/v) PEG 4000, 2µl de tampão 10×T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), 1µl de T4 DNA Ligase e perfez-se 20µl com água desionizada esterilizada (H₂Odd).

$$\frac{vetor(ng) \times inserto(pb)}{vetor(pb)} \times \text{razão_molar} \left(\frac{inserto}{vetor} \right) = inserto(ng)$$

Equação II. 1 – Equação para calcular a quantidade de inserto DNA na reação de ligação

A reação de ligação ocorreu por incubação a 16°C durante 18 horas. Apesar de o fabricante da ligase indicar que a temperatura ótima de atividade da ligase é de 22°C testou-se a 16°C pois, deste modo, a agitação molecular é menor e há maior probabilidade de os fragmentos se encontrarem e estabelecerem ligação. Foi ainda testada a influência de inativar ou não a atividade da ligase. Para se inativar a ligase incubou-se a 65°C durante 10 minutos. O plasmídeo resultante da ligação é o pVAX1_6T'. Após a reação o DNA foi conservado a 4°C até ser usado para transformar células competentes de *Escherichia coli* NZY5α.

No processo de transformação das células competentes teve-se por base o processo descrito em II.1.3, do presente capítulo, testando-se algumas modificações. Foram usadas tanto

células CCP como células *E. coli* NZY5α competentes do fabricante (CCF) (NZYTech). Na etapa em que se inoculou as células em meio líquido usou-se meio SOC (do inglês *Super Optimal Broth*) (Tabela II. 1) (Sigma-Aldrich). Teve-se em consideração o meio SOC para melhorar a eficiência da transformação, uma vez que se trata de um meio mais rico que o meio LB. Posteriormente incubou-se por 4 horas a 37°C com agitação de 200 rotações por minuto (rpm). Aumentou-se o tempo de incubação de 1 hora para 4 horas para se aumentar a probabilidade de se conseguir obter 1 clone positivo, uma vez que as células ficam muito fragilizadas após o choque térmico. Aumentando-se o tempo de incubação, antes de se adicionar o antibiótico seletivo para as células transformadas, permite-se que estas tenham mais tempo para exprimir o factor de resistência ao antibiótico.

Tabela II. 1 - Composição de 0,5l de meio SOC (esterilizado a 121°C, 20 minutos)

| Componente | Quantidade para 0,5L (g) | Concentração final |
|---------------------|--------------------------|--------------------|
| Extrato de levadura | 2,5 | 0,5% |
| Triptona | 10 | 2% |
| Cloreto de sódio | 0,292 | 10mM |
| Cloreto de potássio | 0,932 | 2,5mM |
| Cloreto de magnésio | 0,476 | 10mM |
| Sulfato de magnésio | 0,60183 | 10mM |
| Glucose* | 1,8016 ⁺ | 20mM |

*A glucose é adicionada apenas após a esterilização do meio; ⁺ Dissolvido em 10ml de H₂Odd

O *pellet* obtido após centrifugação (Rotanta 460R, Hettich Zentrifugen, Tuttlingen, Alemanha) das células transformadas foi ressuspenso com cuidado em 200µl de meio SOC e plaqueado em meio 2×TY, suplementado com canamicina (100µg/ml), de modo a se selecionar os clones efetivamente transformados. Como meio sólido usou-se o meio 2×TY uma vez que este, sendo mais rico que o meio LB-agar sólido (Sigma-Aldrich), proporciona um ambiente mais apropriado para o crescimento dos clones e expressão dos plasmídeos.

1.1.3 Validação da construção pVAX1_6T'

Aquando da seleção de clones positivos transformados com a solução do processo de ligação dos fragmentos foi necessário proceder à validação da construção. Primeiramente apurou-se a presença do fragmento napA e do fragmento com os 6 antígenos na construção, recorrendo a um mapa de restrição. Após a confirmação averiguou-se se o plasmídeo expressava os antígenos em células eucarióticas, através da transfeção de células com o pVAX1_6T'.

1.1.3.1 Mapa de restrição

Selecionaram-se clones positivos e cada um foi expandido, em 10ml de meio LB suplementado com 10µl de canamicina (50µg/ml), durante a noite até à sua fase estacionária, a 37°C e uma agitação de 200rpm. Após o crescimento os plasmídeos foram extraídos e purificados com o kit *NZYMiniprep* (NZYTech), de acordo com as instruções do fabricante. Purificou-se apenas 4,5ml da cultura tendo-se preservado a restante cultura com 50% de glicerol a -80°C, de modo a ter um *stock* das células no caso de se validar a construção do pVAX1_6T'. Posteriormente procedeu-se à quantificação do DNA plasmídico, de acordo com o processo descrito em 1.5 do presente capítulo. Seguidamente efetuou-se a hidrólise do DNA plasmídico. Para a confirmação da presença do fragmento da napA hidrolisou-se o DNA plasmídico com as enzimas *FastDigest SmaI* e *FastDigest BamHI*, segundo as condições indicadas na seção 1.1.1 deste capítulo. Para a confirmação da presença do fragmento constituído pelos 6 antígenos hidrolisou-se o DNA plasmídico com as enzimas *Speedy Nhe I* e *Speedy Pst I* (NZYTech), segundo as indicações que constam na seção 1.2.1 do presente capítulo.

Os fragmentos resultantes da reação de hidrólise foram separados por eletroforese, de acordo com os procedimentos descritos na seção II.1.6.

1.1.3.2 Expressão da proteína em culturas de células HEK transfetadas com o plasmídeo pVAX1_6T'

No ensaio de transfeção utilizaram-se linhas celulares HEK 293T (ATCC®, VA, USA). As células HEK 293T foram mantidas numa incubadora de CO₂ (Binder CB 150, Tuttlingen, Alemanha), a uma temperatura de 37°C e 5% de CO₂. O crescimento das células foi efetuado em meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle Medium: Nutrient Mixture* (DMEM) (HyClone™, Thermo Scientific) suplementado com 10% (v/v) de soro bovino fetal (FBS, do inglês *Fetal Bovine Serum*) e 1% (v/v) de L-glutamina, penicilina e estreptomicina (Hyclone, Thermo Scientific), designado abreviadamente de DMEM-10.

Na transfeção teve-se por base o protocolo *Lipofectamine® LTX DNA Transfection Reagents Protocol* (Invitrogen). Inicialmente cresceram-se as células HEK 293T em placas de 6 poços (Nunc™, Thermo Scientific), sob lamelas, tendo cada poço 2ml de meio DMEM_10. O volume de células adicionado a cada poço foi de 300µl, correspondente a 500000 células, e incubou-se durante a noite até se atingir uma confluência de 70-90%. Posteriormente retirou-se todo o meio e cobriu-se as células com meio DMEM_10 suplementado com Lipofectamina (Invitrogen) e adicionou-se 2µg de DNA do pVAX1_6T', obtido nos procedimentos descritos na seção 1.1.2 deste capítulo. Testaram-se diferentes quantidades de Lipofectamina, nomeadamente 6µl, 9µl, 12µl e 15µl. Fizeram-se ainda três controlos: controlo da cultura de células, ao qual não se adicionou Lipofectamina nem plasmídeo; controlo negativo da transfeção, com lipofectamina mas sem plasmídeo; controlo positivo da transfeção, adicionando-se o plasmídeo pVAX1_6T e lipofectamina. Após 4 horas de incubação nas condições de cultura adicionou-se 1mL de meio DMEM_10, após 24 horas o meio das células foi trocado por meio novo (DMEM_10).

- **Deteção da expressão da construção 6T' por imunofluorescência**

Após 48 horas lavaram-se as células com PBS 1× (do inglês *phosphate buffer saline*) (GIBCO®, Life Technologies) e fixaram-se com 4% (v/v) de paraformaldeído (Panreac, Barcelona, Espanha) em PBS 1× durante 15 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente as células foram novamente lavadas 3 vezes com PBS 1×, cada lavagem com uma duração de 5

minutos, e bloqueadas com BSA (do inglês *Bovine Serum Albumin*) (Merck, Darmstadt, Alemanha) a 5% (p/v) em PBS 1× durante 1 hora à temperatura ambiente.

Seguiu-se uma incubação a 4°C, durante a noite, com o anticorpo primário anti-FLAG produzido em rato (Sigma-Aldrich) com uma diluição de 1:500 em BSA a 1% (p/v) em PBS 1×, com o intuito de se detetar o tag FLAG incorporado na construção pVAX1_6T'. Após esta incubação realizaram-se 3 lavagens em PBS 1×, cada uma com uma duração de 5 minutos. Posteriormente incubou-se durante 1 hora à temperatura ambiente com o respetivo anticorpo secundário, nomeadamente o *goat anti-mouse IgG FITC* (isotiocianato de fluoresceína) (Sigma-Aldrich) com uma diluição de 1:500 em BSA a 1% (p/v) em PBS 1×. Para finalizar as células foram lavadas 3 vezes com PBS 1×.

As lamelas foram retiradas e fixadas em lâminas com reagente ProLong® Gold antifade (Merck) e incubadas à temperatura ambiente durante a noite e protegidas da luz. A imunofluorescência foi observada e registada recorrendo a um microscópio Axiovert 40CFL (Zeiss, Jena, Alemanha), com um sistema de epifluorescência incorporado. As fotografias foram obtidas com a câmara digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Zeiss) e processadas com o *software* AxioVision Rel. 4.6.3 (Zeiss).

1.2 pQE30-6T'

A construção do vetor pQE30_6T' teve por base a inserção do fragmento de 6 antígenos presente na construção pVAX1_6T', num vetor pQE30 comercial (Quiagen, Izasa, Carnaxide, Portugal).

1.2.1 Construção do pQE30_6T'

Em primeiro procedeu-se à digestão do DNA plasmídico do pVAX1_6T' com as enzimas *Speedy Nhe I* e *Speedy Pst I* (NZYTech), uma vez que as sequências de reconhecimento destas enzimas delimitam os 6 fragmentos antigénicos (rever Figura II.1, seção II.1.1), obtendo-se assim o inserto desejado. Ambas as enzimas que hidrolisam o DNA dão

origem a extremidades coesivas. Para a hidrólise de 4µg de DNA plasmídico foi utilizado 2µl de cada enzima com 4µl de tampão *10× NZYSpeedyBuffer Orange* (NZYTech), recomendado pelo fabricante, perfazendo-se a mistura até 40µl com H₂Odd. A reação ocorreu por incubação a 37°C por 40 minutos seguindo-se a inativação das enzimas durante 20 minutos a 80°C. Os fragmentos obtidos da reação de hidrólise foram posteriormente separados por eletroforese, segundo os procedimentos descritos na seção 1.6 do presente capítulo. Em seguida extraiu-se e purificou-se a banda de DNA correspondente aos 6 antígenos, segundo o descrito em 1.7 do presente capítulo.

O DNA plasmídico de inserto recuperado foi sujeito a uma reação de ligação ao vetor. Como vetor usou-se DNA plasmídico pQE30 digerido com as enzimas Nhe I e Pst I, proveniente de experiências anteriores realizadas no laboratório da FEUCP, que se encontrava conservado a -20°C. Na reação de ligação usou-se a enzima T4 DNA Ligase (Thermo Fisher Scientific), tendo-se por base as indicações do fabricante para a ligação de extremidades coesivas. Utilizou-se 45ng de vetor juntamente com uma razão molar (vetor:inserto) de 1:5 e de 1:2,5. A mistura foi incubada *overnight* a 16°C. Na reação com uma razão molar de 1:5 procedeu-se à inativação da ligase por incubação durante 10 minutos a 65°C.

Transformaram-se células competentes *E. coli NZY5α*, segundo os procedimentos descritos em II.1.3, com algumas modificações: Incubou-se as células em meio SOC por um período de 4 horas; para a seleção dos clones transformados ressuspendeu-se as células em 200µl de meio SOC; plaqueou-se em placas com meio LB-agar suplementado com 100µg/ml de ampicilina.

1.2.2 Validação da construção pQE30_6T'

Em primeiro avaliou-se a presença do fragmento constituído pelos 6 antígenos por mapa de restrição. Após esta confirmação avaliou-se se o plasmídeo expressava a proteína recombinante em células *E. coli NZY5α* transformadas.

1.2.2.1 Mapa de restrição

Os clones positivos foram expandidos em 10ml de meio LB suplementado com 10µl de ampicilina (50µg/ml), durante a noite até à sua fase estacionária, a 37°C e uma agitação de 200rpm. Após o crescimento os plasmídeos foram extraídos e purificados com o kit *NZYMiniprep*, de acordo com as instruções do fabricante. Purificou-se apenas 4,5ml da cultura tendo-se preservado a restante cultura com 50% de glicerol a -80°C, de modo a ter um *stock* das células no caso de se confirmar a construção do pQE30_6T'. Posteriormente procedeu-se à quantificação do DNA plasmídico, de acordo com o processo descrito em II.1.5. Seguidamente efetuou-se a hidrólise do DNA plasmídico com as enzimas NheI e PstI, de acordo com os procedimentos descritos na seção II.1.2.1, de modo a verificar a presença do fragmento constituído pelos 6 antígenos.

Os fragmentos resultantes da reação de hidrólise foram separados por eletroforese e analisados, de acordo com o procedimento descrito na seção II.1.6.

1.2.2.2 Expressão da proteína recombinante em culturas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pQE30_6T'

Na validação da construção pQE30_6T' avaliou-se a expressão da proteína recombinante em células competentes *E. coli* NZY5α transformadas com a construção. Para tal executou-se os procedimentos descritos ao longo da seção II.2.

1.3 Transformação de células competentes

Na transformação de células quimicamente competentes, por tratamento com CaCl₂ efetuaram-se os seguintes procedimentos:

Inoculou-se 7,5µl de células *Escherichia coli* NZY5α competentes provenientes do fabricante, denominadas CCF em 7,5ml de meio LB e incubou-se a 37°C com uma agitação de 200rpm durante a noite. No dia seguinte efetuou-se a inoculação da cultura que cresceu durante a noite em meio LB novo, numa diluição de 1:100 (500µl da cultura em 50ml de meio LB) e tornou-se a incubar a 37°C com uma agitação de 200rpm, até se alcançar uma densidade ótica entre 0,5 e 0,6. Após se alcançar a densidade ótica desejada as células foram incubadas em gelo por um período de 10 minutos. Centrifugou-se as células durante 10 minutos, a 4000rpm e a 4°C. Os procedimentos efetuados a partir daqui foram executados num ambiente asséptico. Após a centrifugação ressuspendeu-se o *pellet* celular em 20ml de solução fria CaCl₂ a 0,1M. Incubaram-se as células em gelo durante 20 minutos. Em seguida centrifugou-se as células durante 10 minutos, a 4000rpm e a 4°C e ressuspendeu-se o *pellet* em 10ml da solução fria CaCl₂ 0,1M em glicerol a 15%. Por fim as células foram conservadas a -80°C e denominadas células *Escherichia coli* NZY5α quimicamente competentes preparadas (CCP).

Na transformação de células competentes com o plasmídeo começou-se por descongelar as células competentes em gelo. Após o descongelamento de 100µl de células, estas foram colocadas em contato com 1µl de DNA, no caso de DNA purificado, ou 10µl, no caso de DNA diretamente proveniente do processo de ligação de fragmentos de DNA, e agitou-se suavemente. As células foram mantidas em gelo durante 30 minutos, sendo de seguida sujeitas a um choque térmico de durante 45 segundos, seguido por uma incubação no gelo durante 5 minutos. Em seguida adicionou-se 900µl de meio LB. Posteriormente incubou-se durante 1 hora a 37°C com agitação de 200 rpm.

De modo a se selecionar os clones efetivamente transformados plaqueou-se 200µl das células em placas com meio LB-agar sólido suplementado com o antibiótico correspondente ao plasmídeo numa concentração final de 100µg/ml. Nos casos em que se tratava de DNA proveniente do processo de ligação de fragmentos de DNA efetuou-se um passo adicional antes de se plaquear. Nesses casos centrifugaram-se as células durante 5 minutos a 3000rpm e 20°C, com o intuito de concentrar as células. O *pellet* foi ressuspendido em 200µl de meio LB e posteriormente plaqueado como indicado anteriormente.

Finalmente as placas foram incubadas a 37°C durante a noite.

1.4 Isolamento e purificação do DNA plasmídico

Para o crescimento de culturas de bactérias transformadas com plasmídeos inoculou-se 10µl de células em 10ml de meio LB suplementado com o antibiótico característico do plasmídeo, numa concentração final de 50µg/ml. As células foram incubadas a 37°C com uma agitação de 200rpm, durante a noite, até atingirem a sua fase estacionária. Posteriormente os plasmídeos foram extraídos e purificados com o kit *NZYMiniprep*, de acordo com as instruções do fabricante.

1.5 Quantificação do DNA plasmídico

As soluções de DNAs plasmídicos foram quantificadas no fluorímetro Qubit®, tendo por base o kit *Qubit® dsDNA BR Assay* (Invitrogen, Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA). Antes de cada leitura realizou-se sempre uma nova calibração e cada amostra foi lida 5 vezes, considerando-se a concentração da amostra a média das leituras efetuadas.

1.6 Eletroforese em gel de agarose

Os fragmentos consequentes da reação de hidrólise foram separados por eletroforese em gel de agarose (Sigma-Aldrich) a 1% (p/v) em tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE) 1x concentrado, corado com 5µl de Green Safe Premium (NZYTech), a 80 volts até as bandas estarem bem definidas e separadas. Como marcador de peso molecular usou-se o NZYDNA Ladder III (NZYTech). Para a visualização do DNA utilizou-se o transluminador Gel Logic 100 Imaging System Kodak (UVitec, Cambridge, Reino Unido) e a imagem foi processada com o Molecular Imaging Software v.4.0.3 Kodak MI (UVitec).

1.7 Purificação de DNA em gel de agarose

A purificação dos fragmentos do gel de agarose foi realizada com o kit *NZYGelpure*, seguindo-se as indicações do fabricante. Após a purificação procedeu-se à quantificação do DNA de acordo com o do processo descrito em II.1.5. O DNA plasmídico foi conservado a -20°C.

2. PRODUÇÃO DE ANTIGÉNIO 6T' A PARTIR DE *ESCHERICHIA COLI* NZY5a TRANSFORMADAS COM O PLASMÍDEO pQE30_6T'

2.1 Otimização da expressão da proteína recombinante

Procedeu-se ao crescimento de células *E. coli* NZY5a transformadas com o vetor pQE30_6T' em 1L de meio LB suplementado com 100mM de ampicilina, a 37°C e 250rpm. Ao longo da incubação foram realizadas medições de absorvância, a um comprimento de onda de 600nm, até se atingir a fase *mid-log*, nomeadamente até se alcançar uma absorvância de 0,6. Após se alcançar a absorvância desejada induziu-se a expressão proteica com IPTG (do inglês *isopropyl b-D-1-thiogalactopyranoside*) (NZYTech) a uma concentração de 1mM e recolheu-se amostras ao tempo 0 e após 1 hora, 2 horas, 3 horas, 4 horas e 30 minutos e 20 horas, após a indução. As amostras foram posteriormente analisadas por SDS-PAGE seguida de análise por *Western Blot*, de acordo com os procedimentos descrito nas seções II.2.3 e II.2.4, respetivamente.

2.2 Purificação de proteínas

Após a expressão da proteína recombinante as amostras da cultura foram centrifugadas durante 10 minutos, a 4°C e 4800rpm e ressuspensas em tampão de ligação em condições

desnaturantes (ureia 8M, NaCl 500mM, Tris HCl 20mM, β -mercaptoetanol 1mM, imidazole 5mM, pH 8,0) (10ml de tampão por cada grama de *pellet*) e homogeneizadas com uma sonda de ultrassom (Vibra Cell™, Sonics & Materials, EUA) durante 10 ciclos de 1 minuto, com o intuito de promover a lise celular. Posteriormente separou-se o material insolúvel por centrifugação durante 1 hora a 4800 rpm e a 4°C, e filtrou-se o sobrenadante com um filtro de 0,45 μ m não estéril para eliminar possíveis restos celulares. Posteriormente procedeu-se à purificação do sobrenadante por cromatografia de afinidade recorrendo a uma coluna His GraviTrap (GE Healthcare Europe GmbH Sucursal, Carnaxide, Portugal) que permite a purificação de proteínas com sequência de 6 histidinas (His) por cromatografia de afinidade com níquel imobilizado. O processo de purificação consistiu nas seguintes etapas:

Equilibrou-se a coluna com 10ml de tampão de ligação. Carregou-se a coluna com a proteína, lavou-se com 10ml de tampão de ligação e eluiu-se duas vezes com 3ml de tampão de eluição (ureia 8 M, NaCl 500 mM, Tris HCl 20mM, β -mercaptoetanol 1mM, imidazole 500 mM, pH 8.0)

A proteína purificada foi dessalinizada numa coluna PD-10 (GE Healthcare) com 3,5ml de tampão de eluição (NaCl 100 mM, Tris 20mM, EDTA 0,1 mM, pH 7,4).

A expressão da proteína foi posteriormente analisada por *Western Blot*, após SDS-PAGE, usando-se o anticorpo anti-6xHis produzido em rato (GE Healthcare Life Science).

2.3 SDS-PAGE

Com o intuito de confirmar a presença e a integridade estrutural das proteínas recombinantes 6T' purificadas submeteu-se as proteínas purificadas anteriormente a uma eletroforese em gel de poliacrilamina a 10% (p/v) (NuPAGE®, Invitrogen, UK), a 200 volts durante 35 minutos (3501XL EPS electroforese, GE Healthcare) sob condições desnaturantes. Para comparar os resultados teve-se ainda em consideração marcadores moleculares pré-corados BenchMarck™ na gama de 6-180kDa (Invitrogen). Posteriormente efetuou-se a visualização das proteínas com a solução SimplyBlue™ SafeStain (Invitrogen).

2.4 Western Blot

Na realização do *Western Blot* teve-se por base o protocolo NuPAGE® Novex Bis-Tris Midi-Gel (Invitrogen).

Usando um Sistema de transferência semi-seca (Hoefer Semiphor Amersham, GE Healthcare Life Science) as amostras foram transferidas do gel de poliacrilamida para uma membrana de fluoreto de polivinilidene (PVDF, do inglês polyvinylidene difluoride), durante 1 hora a 0,8mA/cm² membrana. Posteriormente a membrana foi lavada e bloqueada por incubação com 10% (p/v) de leite em pó desnatado (Merck KGaA, Alemanha) dissolvido em PBS a 10mM, pH de 7,4 e suplementado com 0,05% (v/v) de Tween 20 (PBST, Sigma- Aldrich). A incubação ocorreu durante 1 hora a uma agitação orbital constante de 100rpm.

Após três lavagens da membrana com a solução de lavagem (PBS 10mM, pH7,4 contendo 0,05% (v/v) Tween 20) incubou-se a membrana durante 2 horas à temperatura ambiente com o anticorpo primário anti-6xHis (Healthcare Life Science), produzido em murganho, diluído em tampão de bloqueio (1:1700), sob uma agitação constante. Posteriormente lavou-se a membrana novamente três vezes com tampão de lavagem e incubou-se com um anticorpo secundário de cabra anti-IgG de murganho conjugado com fosfatase alcalina (Sigma-Aldrich), com uma diluição de 1:2000 em tampão de bloqueio, durante 1 hora e à temperatura ambiente. Lavou-se a membrana novamente três vezes com tampão de lavagem. Para analisar a capacidade do anticorpo anti-rato 6xHis tag reconhecer a proteína recombinante 6T' colorimetricamente usou-se o kit de fosfatase alcalina SIGMA FAST™ BCIP (*5-bromo-4-chloro-3'-indolyphosphate p-toluidine salt*) e NBT (*nitro-blue tetrazolium chloride*) (Sigma-Aldrich), de acordo com as instruções do kit.

2.5 Quantificação de proteínas

A quantificação da proteína foi efectuada com o Kit Bicinchoninic Acid Protein Assay Kit (BCA, Sigma-Aldrich, UK). (do inglês bicinchoninic acid assay), utilizando-se BSA como padrão. Em placas de 96 poços realizaram-se sucessivas diluições de 1:2 da amostra e do padrão em tampão PBS 10mM e pH 7,4 num volume total de 50 µl. À amostra foram adicionados

200µl de mistura reaccional de acordo com as instruções fornecidas com o Kit, seguida de incubação das placas por 1 hora a 37°C. O método de BCA para proteínas tem por base a redução de Cu^{2+} em Cu^{1+} pelas proteínas num meio alcalino. Os iões Cu^{1+} reagem com o ácido bicinconínico dando assim origem a uma tonalidade púrpura intensa. Posteriormente foi realizada a leitura da absorvância das placas, num leitor de placas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha). A absorvância foi lida a um comprimento de onda de 565nm. A determinação da concentração (mg/ml) proteica em cada amostra foi realizada por comparação com a curva de calibração padrão construída com os valores obtidos para a proteína padrão BSA.

3. ENSAIOS *IN VIVO*

3.1 *Crescimento das estirpes de H. pylori*

Para os ensaios *in vivo* e para as análises imunológicas foram utilizadas 17 estirpes de *H. pylori* (Tabela II.2), algumas pertencentes à coleção do Laboratório de Biomédica da FEUCP e outras cedidas pela FFUL. Das 17 estirpes 5 foram usadas para os ensaios *in vivo*, nomeadamente as estirpes 26695, J99, SS1, MONA e 1552/04. A totalidade das estirpes foi empregue nas análises por *Western Blot* das amostras recolhidas dos modelos animais.

Tabela II. 2 - Características das estirpes de *H. pylori*. As estirpes estão identificadas pelo seu nome de coleção.

| H. pylori | | | Paciente | |
|-----------|------|------|-----------|------------|
| Estirpe | cagA | vacA | Patologia | Origem |
| B23/99 | + | + | CG | Portugal |
| P9/92 | + | + | CG | Portugal |
| A3/90 | + | + | CG | Portugal |
| 1152/04 | + | + | DNU | Portugal |
| 655/99 | - | - | DNU | Portugal |
| 173/00 | - | - | DNU | Portugal |
| 1198/04 | + | + | DNU | Portugal |
| 26695 | + | + | Gastrite | Inglaterra |
| Mex 288 | ? | ? | Gastrite | México |
| Arg 54 | ? | ? | Gastrite | Argentina |
| 499/02 | + | + | PUD | Portugal |
| J99 | + | + | UD | EUA |
| SS1 | + | + | UG | Austrália |
| EN32 | ? | ? | Úlcera | Inglaterra |
| MONA | ? | ? | UP | Egipto |
| BAPOUI | ? | ? | UP | Egipto |
| 583 | ? | ? | UP | Suécia |

Nota: Os sinais + e – indicam a presença ou ausência da cagA, respetivamente e o genótipo s1 e s2, respetivamente. O símbolo ? indica que a informação é desconhecida. UG – úlcera gástrica; DNU – dispepsia não ulcerada.

As bactérias foram crescidas em placas de petri com meio *Columbia blood agar base* (Sigma-Aldrich) suplementado com 5% de sangue de cavalo (Oxoid, Basingstoke, Reino Unido) a 37°C, em jarras de anaerobiose contendo uma saqueta geradora de ambiente de microaerofilia (CampyGen, Oxoid) durante 48-72 horas.

A biomassa recolhida e ressuspensa em 500µl de 50% PBS foi centrifugada a 13000rpm durante 1 minuto, a 4°C, e ressuspensa em tampão de sonicação (0.02% Triton X100, 1% Tween 80 em 10mM de PBS, pH 7.4) (10ml de tampão por cada grama de *pellet*). As células foram conservadas em gelo e lisadas com uma sonda de ultrassom durante 10 ciclos de um minuto cada, com um minuto de pausa entre cada ciclo. Após a sonicação o material insolúvel foi separado por centrifugação (13000rpm, 20 minutos, 4°C). Os extratos foram conservados a -80°C.

Os extratos proteicos obtidos de cada estirpe foram posteriormente quantificados pelo método BCA, de acordo com o procedimento descrito na seção II.2.5.

3.2 Preparação do antígeno 6T'

Nos ensaios *in vivo* e nas análises imunológicas posteriores utilizou-se a proteína recombinante 6T', produzida por células de *E. coli* transformadas com o vetor pQE30_6T', e o DNA plasmídico recombinante pVAX1_6T'. A proteína recombinante 6T' empregue foi produzida como é descrito na seção 2.1 do presente capítulo. Posteriormente efetuou-se a quantificação da proteína, segundo os procedimentos descritos na seção II.2.5.

Na produção do DNA plasmídico recombinante começou-se por inocular células competentes transformadas com o vetor pVAX1_6T' em 500ml de meio LB suplementado com 500µl de canamicina (50µg/ml). As células foram incubadas durante a noite a 37°C com uma agitação de 200rpm, até ser atingida a fase estacionária de crescimento. Posteriormente separaram-se as células por centrifugação (10 minutos, 6000g, 4°C). A extração e purificação do DNA plasmídico foram realizadas de acordo com o protocolo do kit de purificação de plasmídeos NZYMaxiprep (NZYTech). Este protocolo é composto pela lise alcalina das células bacterianas e posterior ligação seletiva do DNA plasmídico a colunas carregadas com uma resina aniônica, à base de sílica. Na eluição a carga positiva da resina é neutralizada permitindo assim a eluição do DNA plasmídico em tampão de eluição com um alto teor em sal. A dessalinização foi efetuada por precipitação com isopropanol e o *pellet* obtido foi dissolvido em tampão TE (TrisS 10mM, EDTA 1mM, pH 8). A quantificação do DNA plasmídico foi efetuada segundo os procedimentos descritos na seção II.1.5.

Na análise imunológica dos soros dos murganhos, nomeadamente nas análises por *Western Blot*, foi ainda usado duas construções, previamente preparadas no laboratório de biomédica da FEUCP, para comparação, nomeadamente a construção 6T e a 8T. Os extratos proteicos da construção 8T foram produzidos de acordo com os procedimentos da seção II.2 e a preparação do DNA plasmídico recombinante da construção pVAX1_6T foi efetuada de igual modo à da construção pVAX1_6T', descrito anteriormente.

3.3 Estudos *in vivo* em murganhos

Para os estudos *in vivo*, foram utilizados 7 grupos de murganhos fêmeas BALB/c (n = 2/grupo), em estrita conformidade com a Diretiva de 24 de Novembro (mº86/609 CEE), as leis portuguesas DR n º 31/ 92, D.R. 153 I- A 67 /92 e seguindo toda a legislação.

As doses administradas foram preparadas em PBS estéril (pH 7,4) em condições assépticas, precedentemente à injeção intramuscular nos animais. A primeira injeção dos murganhos foi efetuada no dia 1 e novos reforços foram dados ao dia 17 e 45, por via intramuscular. Todas as doses tinham um volume de 50µl, na gama entre 50µg e 100µg por dose.

O grupo 1 e 2 receberam, por animal, 50µg (em 50µl) do plasmídeo pVAX1_6T' e 50µl de proteína recombinante (6T') do vetor pQE30_6T', respetivamente. Os restantes grupos, de 3 a 7, receberam 50µl dos sonicados proteicos das diferentes estirpes de *H. pylori*, por animal (Tabela II.3).

Tabela II. 3- Condições de cada grupo para a produção de soro

| Grupos | Antígenios | Dose | Via |
|--------|---------------------------|--------------|---------------|
| 1 | pVAX1_6T' | 50µg em 50µl | Intramuscular |
| 2 | Proteína recombinante 6T' | 50µl | |
| 3 | Lisados da estirpe 26695 | | |
| 4 | Lisados da estirpe J99 | | |
| 5 | Lisados da estirpe SS1 | | |
| 6 | Lisados da estirpe MONA | | |
| 7 | Lisados da estirpe 1152 | | |

3.4 Recolha das amostras de soro e análise da resposta imunológica

As amostras de sangue de cada murgancho foram colhidas pela veia da cauda ao dia 41 e pela veia facial ao dia 76. As amostras de sangue recolhidas foram centrifugadas a 18000g, durante 20 minutos e a 4°C e o soro foi recolhido e conservado a -20°C, para posteriores análises.

A titulação de anticorpos no soro foi determinada por ELISA, para todos os grupos, tendo-se agrupado o soro dos murganchos do mesmo grupo. Os soros foram ainda analisados por *Western Blot* para determinar as proteínas de diferentes estirpes de *H. pylori* reconhecidas pelos anticorpos presentes nos diferentes soros.

Os animais foram sacrificados eticamente de acordo com um método previamente descrito por Figueiredo *et al.* (2012). As células do baço dos murganchos foram isoladas e cultivadas por 72h na presença dos respetivos antigénios e os sobrenadantes foram recolhidos e conservados a -80°C para posterior análise da produção das diferentes citocinas de acordo com o descrito por Figueiredo *et al.* (2012).

3.5 Quantificação da resposta imunológica por ELISA

A quantificação de anticorpos, especificamente de IgG, IgG1 e IgG2, contra a proteína recombinante 6T', o plasmídeo pVAX1_6T' e os diferentes homogenizados de diferentes estirpes de *H. pylori* foi determinada de acordo com um método previamente reportado (Figueiredo *et al.*, 2012).

Revestiu-se, durante a noite, as placas de ELISA (Microton®, High binding flat bottom plates, Greiner, Alemanha) com os respectivos antigénios na concentração de 5-10 µg/mL em tampão carbonato de sódio a 100mM (pH 9,6). Posteriormente lavou-se as placas e bloqueou-se com leite desnatado em pó a 5% (p/v) (Merck KGaA, Alemanha), dissolvido em PBS a 10mM, pH 7,4 com 0,05% (v/v) de Tween®20 (PBST, Sigma-Aldrich). Seguidamente as placas foram novamente lavadas e o soro foi testado em sucessivas diluições de 1:2. Como anticorpo secundário, numa diluição de 1:1000, utilizou-se peróxido de rábano de cabra conjugado anti-

IgG de murganho (Sigma, Pooll Dorset, Inglaterra), IgG1 e IgG2a (Serotec, Inglaterra). Por fim foi adicionado o substrato OPD (SigmaFAST™ OPD Kit, Sigma-Aldrich) para detetar a atividade da peroxidase e incubou-se a 37°C. A reação foi parada após 15 minutos pela adição de H₂SO₄ 2,5N a cada poço e efetuou-se a leitura das placas a 490nm num leitor de microplacas (FLUOstar Omega, BMG LABTECH, Alemanha).

3.6 Western Blot

Efetuaram-se SDS-PAGE das proteínas extraídas a partir das diferentes estirpes de *H. pylori* e seguidamente *Western Blot*, usando como anticorpo primário os anticorpos anti-6T' e os anticorpos obtidos da imunização com os lisados da estirpe *H. pylori* 26695, tal como descrito nas seções II.2.3 e II.2.4, respetivamente.

CAPÍTULO III - RESULTADOS E DISCUSSÃO

1. SELEÇÃO DOS ANTIGÉNIOS

Tem-se verificado que a ação protetiva de vacinas constituídas apenas por um antígeno recombinante de *H. pylori* é apenas parcialmente efetiva (Liu *et al.*, 2011), dado quer à não expressão dos antígenos alvo por todas as estirpes quer devido à sua imunovariabilidade. A conceção de uma vacina multi-antigénica para a *H. pylori* apresenta-se assim como uma estratégia para a conceção de uma vacina representativa da imunovariabilidade desta bactéria.

A construção do pVAX1_6T' teve por base a construção pVAX1_6T, anteriormente desenvolvida no laboratório de Biomédica da FEUCP. Como já foi referido, a construção pVAX1_6T é baseada em fragmentos de 6 antígenos, nomeadamente da CagA, VacA, HpaA, UreB, HomB e GroEL. Uma vez que na seleção se teve em consideração métodos e propriedades complexas, fora do âmbito desta dissertação, a seleção deste conjunto de epítomos não será explicada.

Na seção I.4.2. foram descritas as propriedades das principais proteínas antigénicas da *H. pylori* e o seu potencial como antígeno candidato à conceção de uma vacina. Entre os fragmentos que constituem a construção do pVAX1_6T apenas um não aparenta ser um bom antígeno a considerar, a GroEL. Como já foi referido na seção I.4.2.7, a GroEL não é específica da *H. pylori* e o facto de poder haver reatividade com proteínas humanas homólogas implica um risco de desenvolvimento de doenças autoimunes. Por outro lado a NapA é um factor de virulência específico desta bactéria, tem um papel bastante relevante no processo de infeção crónico, é muito imunogénica (revisto em Wang *et al.*, 2006 e Vitorino *et al.*, 2011) e localiza-se tanto à superfície da membrana externa como no citoplasma (revisto em Vitoriano *et al.*, 2011). Tendo isto em conta a construção do pVAX1_6T' teve por base a eliminação do fragmento correspondente à groEL e a adição do fragmento da napA.

2. CONSTRUÇÃO DE PLASMÍDEOS RECOMBINADOS

O plasmídeo pVAX1_6T' é um vetor eucariótico que sob o controlo do promotor do citomegalovírus permite a elevada expressão da proteína recombinante antigénica em células hospedeiras eucarióticas, promovendo assim a vacinação de DNA e a indução da imunidade celular (Zhang *et al.*, 2003). Por outro lado o vetor pQE30_6T' é um vetor procariótico, que permite a expressão da proteína recombinante em células hospedeiras procariotas e assim a sua produção em grande escala, para o desenvolvimento de uma vacina proteica.

2.1 pVAX1_6T'

2.1.1 Isolamento dos fragmentos de interesse

Uma vez que durante o processo de purificação dos fragmentos de DNA de interesse, a partir do pUC57_napA e do pVAX1_6T, se observou sempre perdas de rendimento teve-se em consideração algumas alterações sugeridas pelo fabricante do kit *NZYMiniprep* e *NZYGelpure*, nomeadamente pré-incubar o tampão de eluição para aumentar a eficiência da eluição. Visto que se desejou obter uma eluição concentrada diminuiu-se também o volume de eluição para 30µl.

Visto que o fragmento do gene napA é de dimensões muito reduzidas (213pb), obtém-se uma pequena quantidade por cada digestão, pelo que se realizaram 8 digestões de 4µg do plasmídeo pUC57_napA. De modo a se obter o gene da napA mais concentrado e em 20µl, após a purificação da napA do gel de agarose, todas as eluições obtidas foram submetidas ao protocolo de purificação direta de produtos de PCR com o kit *NZYGelpure*. Relativamente ao pVAX1_6T, uma vez que o fragmento de interesse é de dimensões consideravelmente superiores, nomeadamente de 1353pb, apenas uma digestão de 4µg foi suficiente para obter a quantidade de DNA necessária. A quantidade de DNA plasmídico extraído e purificado constam na Tabela III.1.

Tabela III. 1 – Quantificação do DNA plasmídico

| | Leituras [µg/µl] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média* [µg/µl] |
|-----|--------------------|------|------|------|------|-------|----------------|
| DNA | pVAX1_6T sem GroEL | 61,8 | 61,5 | 61,3 | 61,4 | 61,48 | 61,48 |
| | napA | 16 | 16 | 16,1 | 15,9 | 15,9 | 15,98 |

* Média aritmética simples

2.1.2 Otimização das condições de ligação do fragmento da napA no plasmídeo pVAX1

Com o objectivo de se otimizar o processo de construção do vetor pVAX1_6T' foi necessário testar diversas composições da mistura reacional de ligação, bem como das condições da reação de ligação e de transformação de células competentes.

Uma das razões da ocorrência de tantas dificuldades na reação de ligação dos fragmentos de DNA (napA e pVAX) deve-se ao facto de os fragmentos terem uma das extremidades cega, e de tal modo não apresenta uma eficiência de ligação tão elevada como acontece com fragmentos com extremidades coesivas. Na presença de extremidades cegas há também uma maior tendência de o vetor se auto-ligar, diminuindo o número de clones recombinantes (Chen & Janes, 2002).

Neste trabalho usou-se apenas 45ng de vetor no processo de ligação e não quantidades mais elevadas uma vez que se promoveram razões de inserto:vetor elevadas de forma a aumentar-se a probabilidade de haver contato entre o inserto e o vetor, e por consequência a reação de ligação.

A tabela III.2 resume as diferentes condições de ligação testadas. Por cada amostra obtida após a ligação dos fragmentos, de A3 a A5, testaram-se duas transformações usando-se diferentes tipos de células competentes. De cada amostra de 20µl obtida da reação de ligação utilizou-se 10 µl para cada reacção de transformação, testando-se os diferentes tipos de células competentes, as CCF e CCP. À denominação da amostra acrescentou-se a denominação B1 e B2, de acordo com o tipo de células usadas, CCF e CCP, respetivamente. Como já foi referido, as células competentes CCP foram preparadas para serem utilizadas pelo método de choque térmico. Esta técnica tem a vantagem de não necessitar de equipamento específico no entanto a eficiência do processo de competência é inferior à alcançada pelo método de eletroporação. O

facto de as células CCP terem sido preparadas há mais de 6 meses poderá também influenciar a sua estabilidade. Na tabela III.2 constam ainda o número de clones obtido em cada experiência.

Tabela III. 2- Condições da reação de ligação, tipo de células competentes usadas na transformação e número de clones obtidos após inoculação das células transformadas em meio seletivo

| Amostra | Razão molar* | Estado da ligase | | Número de clones |
|---------|--------------|------------------|---------------------|------------------|
| | | após a reação de | Células competentes | |
| | | ligação | | |
| A1 | 1:48 | I | CCF | 2 |
| A2 | 1:24 | NI | CCF | 21 |
| A3B1 | 1:50 | I | CCF | 0 |
| A3B2 | 1:50 | I | CCP | 0 |
| A4B1 | 1:50 | NI | CCF | 2 |
| A4B2 | 1:50 | NI | CCP | 0 |
| A5B1 | 1:25 | I | CCF | 2 |
| A5B2 | 1:25 | I | CCP | 0 |
| A6B1 | 1:25 | NI | CCF | 4 |
| A6B2 | 1:25 | NI | CCP | 0 |

Nota: * - razão molar vetor:inserto; I – inativada; NI – não inativada; CCF – células competentes do fornecedor; CCP – células competentes preparadas

Observou-se que a condição que implicou o crescimento de um maior número de clones em meio selectivo foi a A2, que correspondeu à utilização de uma razão de inserto: vector de 1:25, da inativação das enzimas de ligação após a reação de ligação e da utilização de células competentes CCF.

A razão de DNA entre inserto e vector na mistura de ligação tem um impacto significativo na eficiência da reação de ligação. No caso de a concentração ser demasiado baixa o contacto entre o inserto e o vector será um evento mais raro, resultando num baixo número de ligações de plasmídeos. Por outro lado, nos casos em que a concentração é demasiado elevada haverá uma maior colisão entre os fragmentos, dando origem a moléculas compostas por vários fragmentos. Como é possível ver pelos resultados obtém-se uma menor eficiência de ligação com uma razão molar de 1:50, comparativamente a 1:24/25. Para razões molares inferiores, tais como 1:2, 1:5 e 1:10 não se obteve sucesso nas ligações (resultados não apresentados), mostrando-se assim que razões demasiado baixas também diminuem a eficiência de ligação.

Ao analisar-se as restantes amostras verifica-se que houve o crescimento de clones em apenas 3 experiências, para além da A1 e A2, nomeadamente nas condições A4B1, A5B1 e A6B1, todas utilizando-se células competentes CCF. Assim sendo, as células CCP demonstram não ser o suficientemente competentes na transformação de plasmídeos recombinantes ao contrário das células CCF.

2.1.3 Validação da construção pVAX1_6T'

Concluída a construção do vetor pVAX1_6T' obteve-se o mapa de restrição ilustrado na figura III.1 e confirmou-se a expressão da proteína recombinante 6T' em culturas de células HEK transfetadas com o plasmídeo pVAX1_6T'.

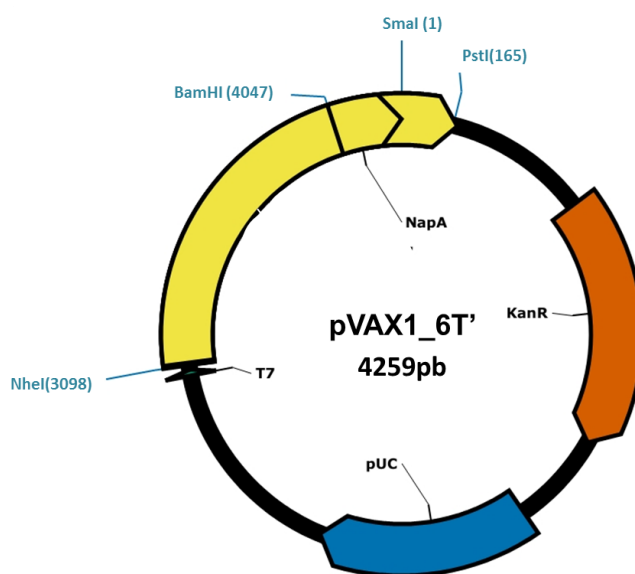


Figura III. 1 - Mapa de restrição do vetor pVAX1_6T'. Na representação esquemática estão descritos alguns constituintes do plasmídeo, tais como o gene de resistência à canamicina (KanR), a origem de replicação (pUC), o local de iniciação/promotor (T7) e os antígenos da *H. pylori*. Os antígenos são delimitados pelas enzimas de restrição NheI e PstI e o fragmento da napA pela BamHI e SmaI. Na hidrólise do plasmídeo com as enzimas SmaI e BamHI obtém-se um fragmento com 213pb, correspondente ao epítipo da napA, e um outro com 4046pb. Na hidrólise do plasmídeo com as enzimas NheI e PstI obtém-se um fragmento com 1326pb, correspondente aos 6 antígenos, e um fragmento com 2933pb. (pb: pares de base). (Adaptado de imagens obtidas pelo *software* PlasmaDNA).

2.1.3.1 Mapa de restrição

Após a transformação de células competentes *Escherichia coli* NZY5a, como foi anteriormente descrito, procedeu-se à seleção de colónias transformadas de modo a verificar a presença do fragmento napA nos clones positivos. Selecionou-se um clone da amostra A1 e dois clones da amostra A2. Cresceram-se as células transformadas e prepararam-se soluções *stock* dos três clones com 50% de glicerol e conservou-se a -80°C. Seguidamente procedeu-se à extração do DNA plasmídico, como indicado na seção II.1.4. Hidrolisou-se o DNA plasmídico dos clones com:

- As enzimas SmaI e BamHI, para assim remover o fragmento da napA de aproximadamente 213pb (rever mapa de restrição na figura III.1).
- As enzimas NheI e PstI, de modo a se isolar o fragmento constituído pelos 6 antígenos, de aproximadamente 1326pb (rever mapa de restrição na figura III.1).

Posteriormente os fragmentos resultantes da hidrólise foram separados por eletroforese, de acordo com as indicações descritas na seção II.1.6, e os padrões de migração são ilustrados na figura III.2.

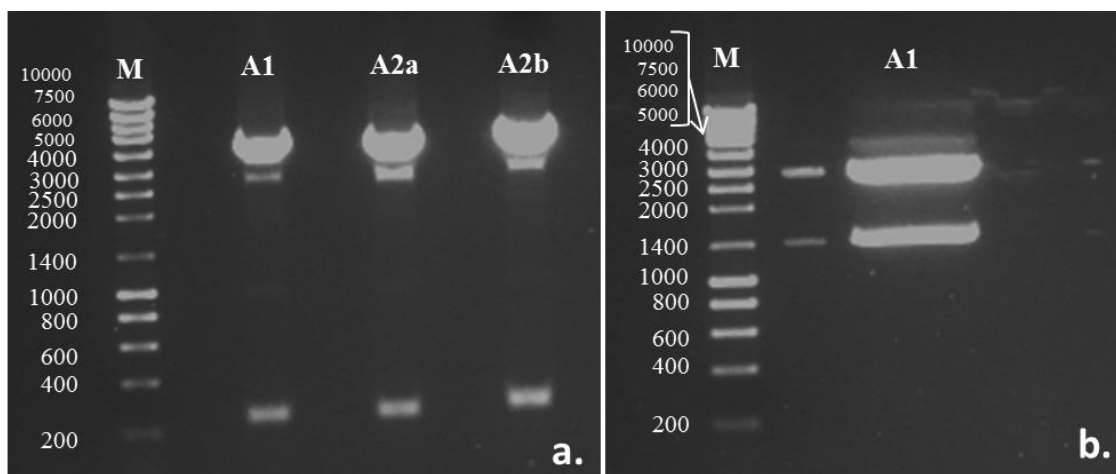


Figura III. 2 – Mapa de restrição para confirmar a presença do fragmento napA (a.) e do fragmento constituído pelos 6 antígenios (b.) na construção pVAX1_6T’ , após hidrólise com enzimas de restrição do plasmídeo pVAX1_6T’ e subsequente separação dos fragmentos obtidos em electroforese de agarose. M - marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; A1 – clone da amostra A1; A2a – clone da amostra A2; A2b – segundo clone da amostra A2. (Adaptado de imagens obtidas pelo transluminador Gel Logic 100 Imaging System Kodak processadas com o Molecular Imaging Software v.4.0.3 Kodak MI).

Pela análise da Figura III.2a e III.2b observa-se que os clones transformados continham o vetor pVAX1_6T’. Na figura III.2a. é possível visualizar uma banda próxima dos 200pb em cada amostra (A1, A2a e A2b), correspondendo ao fragmento da napA. A banda de DNA de aproximadamente 3000pb poderá corresponder ao DNA plasmídico não digerido, uma vez que o DNA circular tende a migrar mais rápido que o DNA linear, não migrando de acordo com o seu peso molecular, ao contrário do que acontece com a forma linear. As bandas que se localizam entre 4000pb e 5000pb correspondem ao pVAX1_6T’ digerido. Relativamente à Figura III.2b é possível observar nitidamente uma banda nos 1400pb, correspondendo esta ao conjunto de 6 antígenios. As duas bandas que se observam entre o poço do marcador e da amostra A1 resultam da dispersão de DNA ao colocar-se no poço.

2.1.3.2 Expressão da proteína em culturas de células HEK 293T transfetadas com o plasmídeo pVAX1_6T’

A transfeção de linhas celulares HEK 293T com o vetor pVAX1_6T’ teve como objetivo verificar se o antígeno multi-epítipo recombinado é expresso em células eucarióticas.

Em paralelo com a transfecção destas células com o vetor pVAX1_6T' foi realizado um controlo negativo de transfecção (sem DNA) e um controlo positivo com o vetor pVAX1_6T. Num primeiro teste testaram-se diferentes volumes do reagente de transfecção lipofectamina, nomeadamente 6µl, 9µl, 12µl e 15µl. Neste primeiro ensaio não se fixaram as células em lamelas, verificando-se um número reduzido de células transfectadas (Figura III.3). No entanto verificou-se que para todas os volumes de lipofectamina ocorria a transfecção das células bem como a expressão da proteína recombinante do vetor pVAX1_6T'.

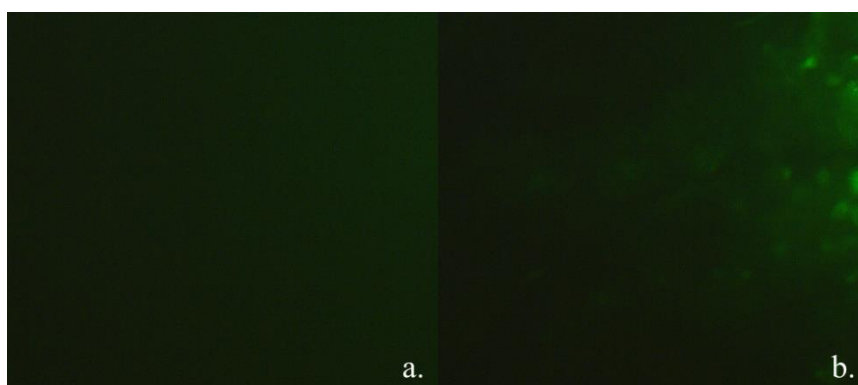


Figura III. 3 - Transfecção de células HEK 293T com o vetor pVAX1_6T', e respetivo controlo negativo, com 6µl de lipofectamina. (a.) - controlo negativo da transfecção, sem DNA; (b.) - transfecção com o vetor pVAX1_6T'. (Imagens adquiridas com uma câmara digital de alta resolução AxioCam MRc5 (Zeiss) e processadas com o *software* AxioVision Rel. 4.6.3 (Zeiss)).

Num segundo ensaio, em que se fixou as células em lamelas, optou-se por se usar apenas 6µl de lipofectamina, não só para rentabilizar o reagente mas também para diminuir a probabilidade de ocorrer citotoxicidade (Figura III.4).

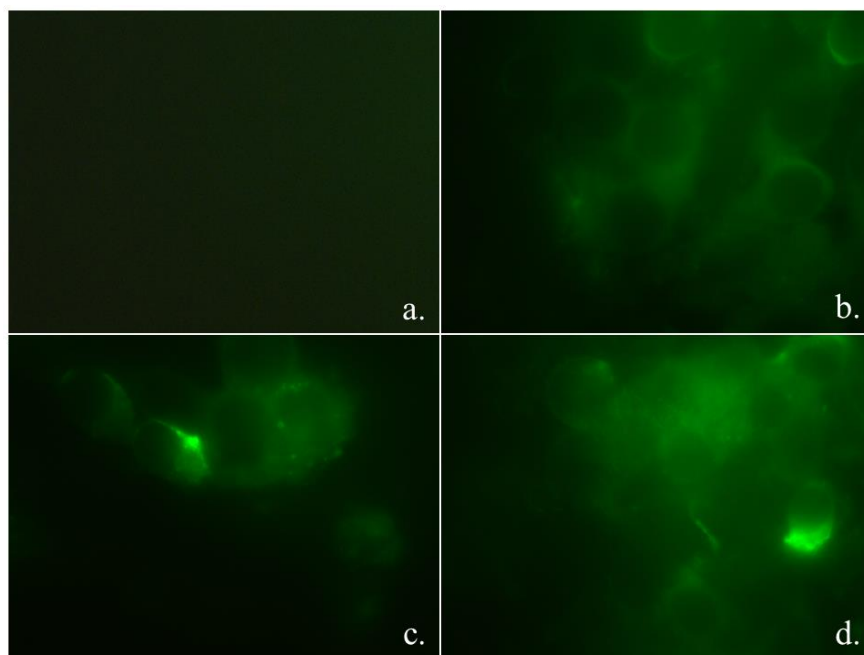


Figura III. 4 - Tranfeção de células HEK 293T com o vetor pVAX1_6T', e respetivos controlos, com 6µl de lipofectamina. (a.) - controlo negativo da transfeção, sem DNA; (b.) - controlo positivo da transfeção com o vetor pVAX1_6T; (c.) e (d.) – transfeção com o vetor pVAX1_6T'. (Imagens adquiridas com uma câmara digital de alta resolução Axiocam MRc5 (Zeiss) e processadas com o *software* AxioVision Rel. 4.6.3 (Zeiss)).

Ao comparar-se a figura III.3 com a figura III.4 verifica-se que a fixação de células em lamelas permite uma melhor observação das células transfetadas.

Ao analisar-se a figura III.4 verifica-se que no controlo negativo não se observa nenhuma fluorescência, tal como previsto, uma vez que não se adicionou DNA (figura III.4a). No controlo positivo (figura III.4b), em que se transfetou as células com o vetor pVAX1_6T, já é possível visualizar fluorescência, confirmando-se assim a presença de células transfetadas com o DNA plasmídico e a expressão do respetivo antígeno 6T recombinante. Na figura III.4c e na figura III.4d é possível observar fluorescência, indicando assim a existência de células transfetadas com o pVAX1_6T' bem como a expressão da proteína recombinante 6T'.

2.2 pQE30_6T'

2.2.1 Construção do pQE30_6T'

Na construção do pQE30_6T' foi necessário isolar o fragmento de DNA com os seis antígenos, que se encontra na construção pVAX1_6T'. Para tal procedeu-se à hidrólise do DNA plasmídico pVAX1_6T' com as enzimas PstI e NheI (rever mapa de restrição da figura III.1), obtendo-se assim o inserto de interesse. Havia no *stock* do laboratório de Biomédica da FEUCP o vetor pQE30 digerido com as enzimas PstI e NheI, com uma concentração de 6,98µg/ml.

Com o intuito de calcular a quantidade de DNA plasmídico do fragmento dos seis antígenos extraído e purificado do gel de agarose, para seguidamente se proceder à ligação do inserto ao vetor, usou-se o kit *Qubit® dsDNA BR Assay*, de acordo com as instruções do fabricante. Na tabela III.3 constam as leituras efetuadas e a concentração média obtida.

Tabela III. 3 – Quantificação de DNA do fragmento constituído pelos seis antígenos

| | Leituras [µg/µl] | 1 | 2 | 3 | 4 | 5 | Média* [µg/µl] |
|-----|------------------|------|------|------|----|------|----------------|
| DNA | 6 antígenos | 10,9 | 10,8 | 10,9 | 11 | 10,9 | 10,9 |

*Média aritmética simples

Uma vez que no caso da construção do pQE30_6T' as extremidades do inserto e do vetor são ambas extremidades coesivas é esperado uma eficiência de ligação superior à obtida com os fragmentos com extremidades cegas. Como tal, na mistura reacional da ligação, testaram-se razões molares inferiores às usadas na construção do pVAX1_6T'. Testou-se uma razão molar (vetor:inserto) de 1:2,5 e 1:5, tendo-se denominado as amostras de B1 e B2, respetivamente. Após a transformação de células *Escherichia coli* NZY5α competentes verificou-se que em ambas as amostras houve uma elevada eficiência da transformação. Optou-se por isolar cinco clones da amostra B1, uma vez que da amostra B2 era mais árdua a seleção

de clones devido à elevada concentração de clones. Os clones isolados foram denominados B1a, B1b, B1c, B1d e B1e.

2.2.2 Otimização da expressão da proteína recombinante 6T'

Na produção de proteínas recombinantes em células *E. coli* transformadas com o vector pQE30_6T' é importante determinar o tempo óptimo de paragem da cultura após indução da expressão do gene heterólogo, de modo a maximizar o rendimento de proteína expressa. A indução da expressão da proteína foi efetuada no início da fase exponencial de crescimento, de forma a estarem ainda disponíveis nutrientes para o crescimento e expressão da proteína (Olaofe *et al.*, 2010).

Como tal, com o intuito de determinar qual a fase que desencadeia uma ótima expressão da proteína recombinante 6T', incubou-se a cultura de células *E. coli* transformadas com o vetor pQE30_6T' a 37°. Após a indução da expressão analisou-se o crescimento da cultura através de leituras da densidade ótica a 600nm, ao longo de 20 horas de incubação (Figura III.5).

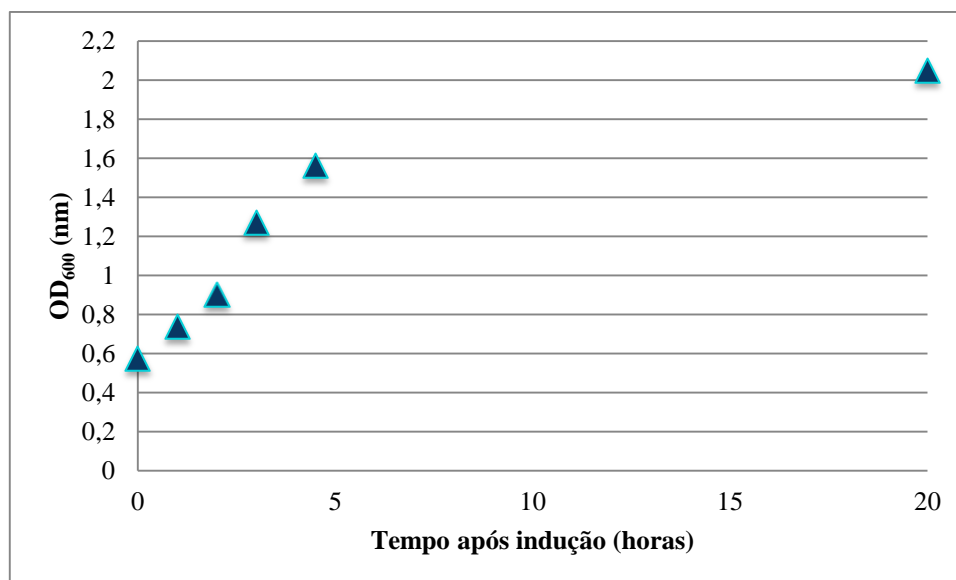


Figura III. 5 - Curva de crescimento, após indução com IPTG, da cultura de células *E. coli* expressando a proteína recombinante 6T'.

Pela análise da figura III.5 é possível constatar o início da fase exponencial de crescimento após a indução com IPTG, ou seja, ao tempo 0, onde a OD_{600nm} é 0,6. Após o tempo 0 as células dão início ao período de divisão celular exponencial e à síntese da proteína recombinante. Ao analisar-se, por *Western Blot*, as amostras recolhidas após indução da expressão da proteína nas culturas de *E. coli* (figura III.6), observa-se uma banda mais intensa de aproximadamente 48,8 kDa, similar à dimensão da proteína recombinante 6T', de 45,59kDa. A proteína recombinante 6T' tem um tag de 6×his que é detetado no *Western Blot* pelo anticorpo anti-His. Relativamente aos resultados de SDS-PAGE observa-se um arrastamento de proteínas, para além da banda de aproximadamente 48,8kDa, devido ao facto de as amostras recolhidas não terem sido purificadas, tendo-se assim na amostra, para além da proteína recombinante 6T', outras proteínas expressas pela *E. coli*. No tempo 0 (T0) observa-se a banda correspondente à proteína recombinante 6T', a qual poderá ter resultado da expressão da proteína por outras vias independentes da adição de IPTG (Weng *et al.*, 2006). É possível observar que após a indução por IPTG a intensidade do sinal da banda de aproximadamente 48,8kDa aumenta ao longo do tempo, sugerindo que a expressão da proteína aumenta ao longo do tempo, estabilizando 3 horas após a indução com IPTG (T3).

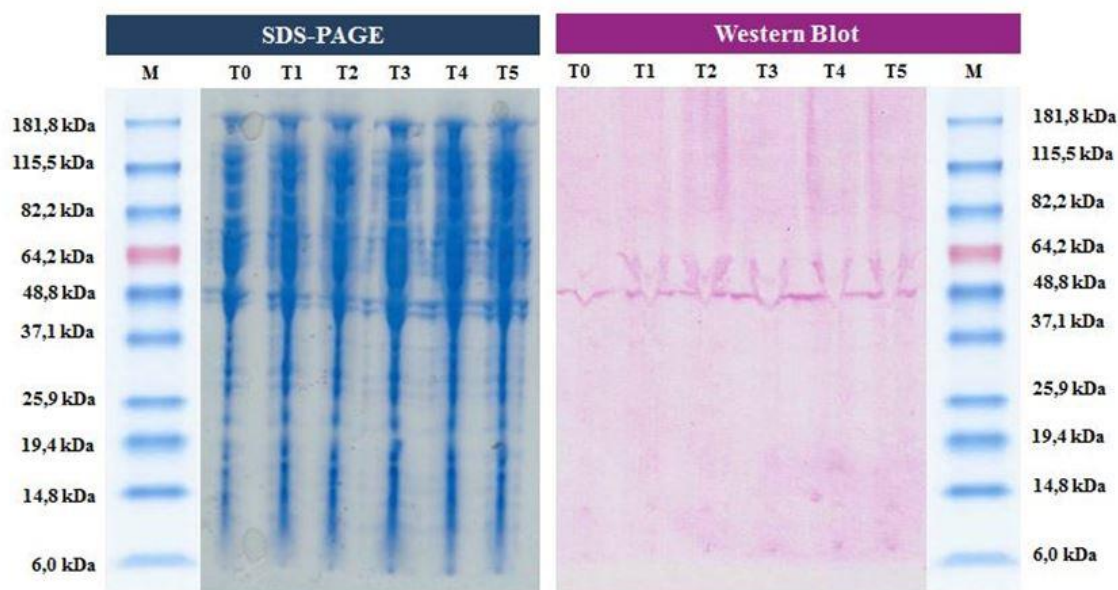


Figura III. 6 - SDS-PAGE e Western Blot da proteína recombinante 6T' expressa em culturas de *E. coli* e detectada com anticorpos anti-His. M – marcador de peso molecular pré-corado BenchMarck™; T0 – amostra antes da indução com IPTG; T1 – amostra após 1 hora de indução com IPTG; T2 – amostra após 2 horas de indução com IPTG; T3 – amostra após 3 horas de indução com IPTG; T4 – amostra após 4 horas de indução com IPTG; T5 – amostra após 5 horas de indução com IPTG.

Quando as células atingem a fase estacionária a expressão das proteínas é inibida, uma vez que há uma diminuição da quantidade de nutrientes disponível, reduzindo-se assim a divisão celular e expressão da proteína (Olaofe *et al.*, 2010). Deste modo, a expressão da proteína recombinante por períodos longos não é vantajosa, uma vez que a taxa de células que expressam a proteína reduz ao longo do tempo, havendo assim uma estagnação na produção da proteína recombinante específica e consequentemente do rendimento do processo (Teich *et al.*, 1998). Assim sendo, de acordo com os resultados obtidos, o tempo ideal de incubação após a indução de IPTG, para maximizar a expressão da proteína recombinante 6T', é de 3 horas.

2.2.3 Validação da construção pQE30_6T'

Confirmou-se a construção do vetor pQE30_6T' através de um mapa de restrição ilustrado na figura III.7, bem como com a expressão da proteína heteróloga em culturas de células *E. coli*.

A partir da coletânea *Sequence Manipulation Suite* foi possível determinar a massa molar e o ponto isoelétrico da proteína recombinante. A proteína recombinante 6T' tem uma massa molar de 45,59kDa e um ponto isoelétrico teórico de 12,47.

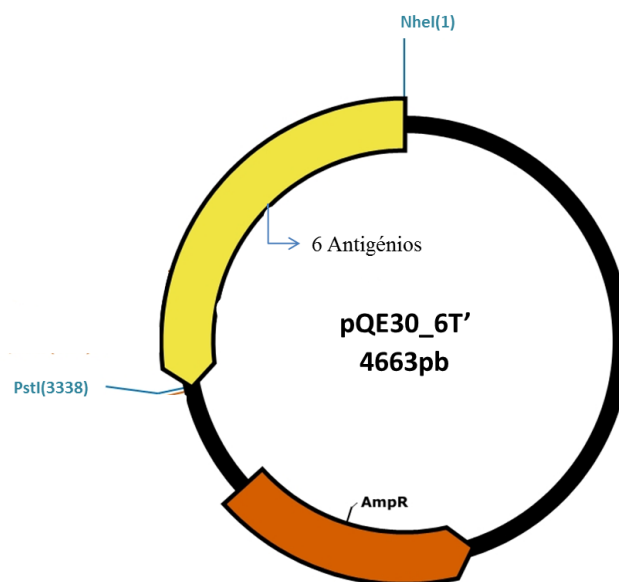


Figura III. 7 - Mapa de restrição do vetor pQE30_6T'. Na representação esquemática encontra-se discriminado o gene de resistência à ampicilina (AmpR) e a região correspondente aos 6 antígenos. Os antígenos são delimitados pelas enzimas de restrição NheI e PstI. Na hidrólise do plasmídeo com as enzimas NheI e PstI obtém-se um fragmento com 1326pb, correspondente aos 6 antígenos, e um fragmento com 3337pb (pb: pares de base). (Adaptado de imagens obtidas pelo *software* PlasmaDNA).

2.2.3.1 Mapa de restrição

Após crescimento dos clones selecionados da amostra B1 procedeu-se à extração do DNA plasmídico e hidrólise com as enzimas PstI e NheI, de modo a verificar a presença do fragmento dos 6 antígenos na construção do pQE30_6T' (rever mapa de restrição na figura III.7). Os fragmentos resultantes da hidrólise foram separados por eletroforese e os padrões de migração obtidos estão ilustrados na Figura III.8.

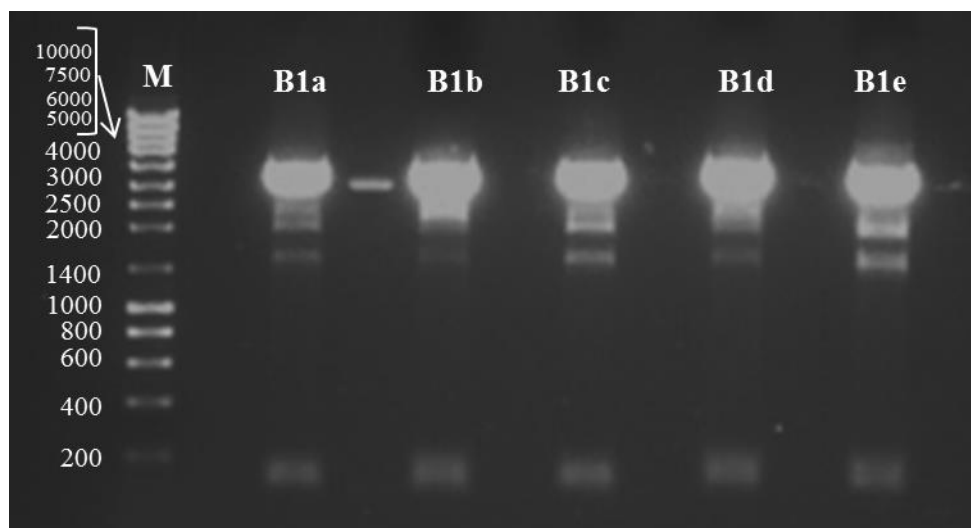


Figura III. 8 - Confirmação da presença dos 6 antígenios na construção pQE30_6T', por eletroforese em gel de agarose, e após hidrólise com enzimas de restrição dos plasmídeos isolados dos clones de *E. coli*. M - marcador de peso molecular NZYDNA Ladder III; B1a – primeiro clone da amostra B1; B1b – segundo clone da amostra B1; B1c – terceiro clone da amostra B1. B1d – quarto clone da amostra B1. B1e – quinto clone da amostra B1. (Adaptado de imagens obtidas pelo transluminador Gel Logic 100 Imaging System Kodak processadas com o Molecular Imaging Software v.4.0.3 Kodak MI).

O padrão de migração dos 5 clones da amostra B1 deveria ser constituído por duas bandas, uma correspondente ao fragmento com os 6 antígenios (1326pb) e outra correspondente ao PQE30_6T' sem os 6 antígenios (3337pb). Ao analisar a Figura III.6 verifica-se que estas duas bandas estão presentes nas 5 amostras: B1a, B1b, B1c, B1d e B1e. No entanto é possível verificar a existência de uma banda perto dos 200pb e um arrastamento entre os 2000pb e 3000pb. A banda próxima dos 200pb sugere a presença do vetor pQE30 comercial, correspondendo a banda ao fragmento obtido pela hidrólise das enzimas empregues (124pb). A presença do pQE30 comercial poderá indicar que a solução de pQE30 digerido, que se encontrava em *stock* e que foi usada na reação de ligação, continha também pQE30 não digerido. Não foi analisada a pureza da solução de pQE30 digerido usada e como tal esta poderia não estar pura e conter plasmídeo não digerido. A banda de arrastamento que é possível observar poderá corresponder ao DNA plasmídico pQE30_6T' e pQE30 comercial não digerido na forma circular, e como tal apresentar uma maior migração comparativamente ao DNA linear. A banda que se observa entre o poço da amostra B1a e a amostra B1b resulta da dispersão de DNA ao ser colocado no poço.

2.2.3.2 Expressão da proteína recombinante em culturas de *E. coli* transformadas com o plasmídeo pQE30_6T'

Procedeu-se à expressão da proteína recombinante para os dois clones B1c e B1d de células transformadas com o vetor pQE30_6T'.

A cauda de 6×His associada à proteína recombinante permite a purificação das proteínas através da utilização de uma cromatografia de interação metálica, a qual permite obter num só passo cromatográfico níveis de pureza superiores a 95% (Terpe, 2003; Arnau *et al.*, 2011). A purificação da proteína recombinante foi realizada em condições desnaturantes de modo a se obter uma maior pureza, dado a maior exposição da cauda de His à superfície da proteína (Terpe, 2003; Triccas *et al.*, 1998).

Após a purificação e concentração da proteína recombinante, por ultrafiltração com uma membrana com *cut-off* de 10kDa, procedeu-se à quantificação da proteína, segundo o método BCA (seção II.2.5). Este método é baseado na redução de Cu^{2+} em Cu^{1+} pelas proteínas num meio alcalino. Por sua vez, os iões Cu^{1+} reagem com o BCA, resultando no desenvolvimento de uma tonalidade púrpura intensa, reação esta detetada pela leitura da absorvância a 565nm. Uma vez que a produção de Cu^{1+} depende da concentração da proteína a quantificação pode ser determinada por comparação com a curva de calibração, obtida com os valores de absorvância de proteínas padrão com concentrações conhecidas (Krieg *et al.*, 2005; Walker, 2009).

Obteve-se então uma concentração de 45µg/ml para a amostra B1c e 96µg/ml para a amostra B1d.

As amostras (B1c e B1d) da proteína recombinante 6T' purificadas foram submetidas a uma SDS-PAGE e seguidamente identificadas em *Western Blot* com anticorpos anti-His (figura III.9).

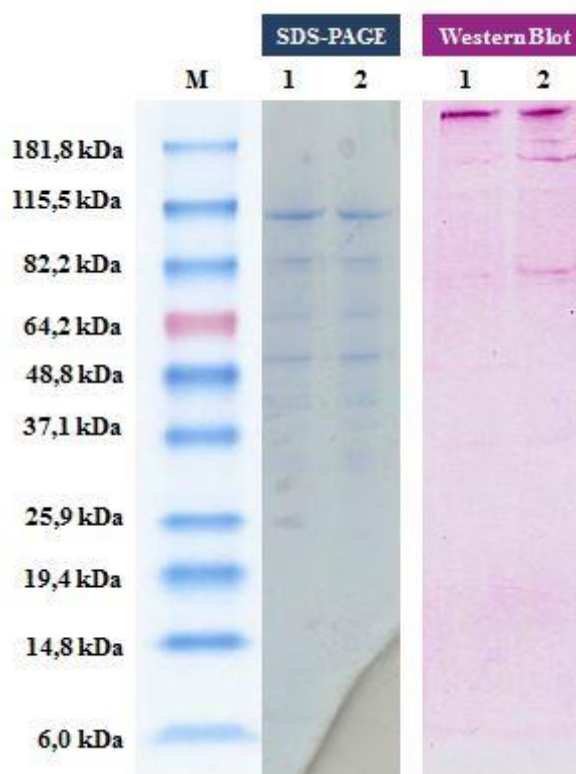


Figura III. 9 – SDS-PAGE e *Western Blot* da proteína recombinante 6T' purificada detetada com anticorpos anti-His. A imagem do SDS-PAGE representada é após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose, sendo um controlo da transferência das proteínas. M – marcador de peso molecular pré-corado BenchMarck™; 1 – amostra B1c da proteína recombinante 6T'; 2 – amostra B1d com a proteína recombinante 6T'.

Nos resultados de *Western Blot* apresentados na figura III.9 é possível observar uma banda intensa de aproximadamente 181,8kDa, podendo esta corresponder a multímeros da proteína recombinante na sua forma insolúvel, dado que a proteína recombinante 6T' apresenta 45,59kDa. O facto de a proteína se encontrar na sua forma insolúvel não deve influenciar a sua imunogenicidade. Após a coloração do gel do SDS-PAGE após a transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose (figura III.9) é ainda possível observar uma banda de aproximadamente 48kDa. Assim sendo, o facto de esta não ser visível na imagem de *Western Blot* (figura III.9) poderá dever-se a as proteínas não terem sido transferidas na sua totalidade.

3. ENSAIOS *IN VIVO*

3.1 Quantificação dos extratos proteicos das estirpes de *H. pylori*

Após a obtenção dos extratos proteicos das diferentes estirpes de *H. pylori* procedeu-se à sua quantificação pelo método de BCA. Na tabela III.4 consta a concentração proteica de cada extrato bem como o respetivo desvio padrão.

Tabela III. 4 – Concentração dos lisados proteicos das estirpes de *H. pylori*

| Estirpe | Concentração [µg/ml]* | Desvio padrão* |
|---------|-----------------------|----------------|
| B23/99 | 755 | 94 |
| 26695 | 549 | 66 |
| J99 | 465 | 35 |
| 499/02 | 1504 | 248 |
| BAPOUI | 115 | 7 |
| 1198/04 | 1201 | 122 |
| MONA | 1686 | 244 |
| 583 | 2487 | 139 |
| P9/92 | 105 | 1 |
| A3/90 | 474 | 23 |
| 173/00 | 828 | 39 |
| SS1 | 2281 | 881 |
| EN32 | 900 | 182 |
| 655/99 | 1866 | 568 |
| Mex 288 | 4118 | - |
| Arg 54 | 2265 | 371 |
| 1152/04 | 1132 | 143 |

Nota: (*) – Obtido com 4 leituras e valores arredondados à unidade; (-) – inexistência de desvio padrão uma vez que a concentração teve por base um único valor

Pela análise da tabela III.4 verifica-se que tanto para a estipe BAPOUI como para a estirpe P9/92 se obteve baixas concentrações de proteína. Uma vez que entre as restantes estirpes constam estirpes com características similares a estas duas (rever tabela II.2) optou-se por excluir estas duas estirpes das análises realizadas por *Western Blot*. Num trabalho futuro

estas estirpes poderão ser analisadas. Relativamente à estirpe Mex 228, o valor obtido não resulta da média das quantificações mas apenas de um único valor.

3.2 Quantificação das doses administradas

Na preparação das doses a administrar aos murganhos não se normalizou as concentrações das doses, mas sim o volume. Como tal, para confirmar que os resultados não seriam influenciados por diferenças desmedidas nas quantidades de antígenos administradas procedeu-se à quantificação das amostras administradas, pelo método BCA descrito na seção II.2.5. Na tabela III.5 contam os valores de concentração de cada amostra bem como a quantidade de antígeno presente em cada dose de 50µl administrada.

Tabela III. 5 – Quantidade de antígeno em cada dose administrada aos murganhos

| Antígenos | Concentração [µg/ml]* | Desvio padrão*+. | Dose (ng)* |
|----------------------------------|-----------------------|------------------|------------|
| 26695 | 694 | 62 | 35 |
| J99 | 2034 | 163 | 102 |
| SS1 | 1232 | 65 | 62 |
| MONA | 1119 | 229 | 56 |
| 1152 | 1051 | 96 | 53 |
| Proteína recombinante 6T' | 278 | 104 | 14 |

Nota: (*) – Valores arredondados à unidade; (+) – desvio padrão tendo em conta 8 leituras

No presente trabalho o objetivo é produzir anticorpos que vão ser usados em *Western Blot*. Como é possível observar na Tabela III.5 a concentração das doses administradas é variável. A dose de antígeno utilizada influencia tanto a resposta primária, nomeadamente a quantidade de anticorpo produzido, bem como a resposta secundária de anticorpos perante um novo reforço. Quando se usam doses demasiado baixas de antígenos o sistema imunitário poderá não reagir, havendo assim tolerância ao antígeno. Por outro lado, quando as doses são demasiadamente elevadas poderão inibir a resposta imunitária a uma exposição subquente, havendo assim um desenvolvimento de tolerância. Delinear estes limites revela-se pertinente em ensaios de imunização, no entanto, no presente trabalho pretende-se apenas produzir anticorpos para

análises subsequentes. Como tal, neste trabalho não foram determinadas as melhores concentrações da dose de 6T’.

3.3 *Estudo do soro produzido em murganhos*

Com o intuito de se produzir anticorpos e analisar a resposta imune desencadeada pela construção pVAX1_6T’ e pela proteína recombinante 6T’ administraram-se ambas as vacinas (proteica e de DNA plasmídico) a murganhos BALB/c, por via intramuscular. Para além das construções foram também administrados extratos proteicos obtidos de sonicados de diferentes estirpes de *H. pylori* (rever tabela II.3). Com a exceção de um dos murganhos do grupo 1 (administrado com a construção pVAX1_6T’), todos os murganhos se mantiveram saudáveis. Num dos murganhos do grupo 1 verificou-se um baixo peso comparativamente aos restantes murganhos (dados não ilustrados). Desde o dia 1 que este murganho apresentou um peso inferior aos restantes e indícios de não estar saudável, podendo-se supor que a sua condição de saúde não foi resultante da administração da construção.

Ao dia 17 foi dada uma nova dose de reforço a cada murganho e ao dia 41 foram recolhidas amostras de sangue pela veia da cauda. Para averiguar a necessidade de um novo reforço foi apenas analisado o título de IgG presente. Na análise do soro verificou-se um título de IgG superior a 128, em todas as amostras. No entanto, dado que alguns soros apresentaram uma reação de baixa intensidade optou-se por efetuar uma 2ª dose de reforço a todos os murganhos ao dia 45.

Um dos objetivos deste trabalho era a produção de anticorpos anti- 6T’ e anti-*H. pylori*. Como tal, após a recolha do soro, ao dia 76, efetuou-se a quantificação de imunoglobulinas específicas presentes nos diferentes soros obtidos para averiguar a produção de anticorpos.

3.3.1 *Quantificação de imunoglobulinas G*

As imunoglobulinas G humanas são divididas em 4 subclasses (IgG1, IgG2, IgG3 e IgG4), sendo cada classe elicitada por diferentes tipos de antígenos e contribuindo de diferentes

formas na imunidade humoral contra os agentes patogénicos. As subclasses IgG1 e IgG3 são predominantemente restritas a antígenos proteicos de bactérias e vírus, enquanto que a classe IgG2 é usualmente produzida em resposta a antígenos de carboidratos (revisto em Visciano *et al.*, 2012). A subclasse de IgG produzida é ainda afetada por diversos fatores, nomeadamente a estrutura e quantidade de antígeno, a via de estimulação antigénica e a duração da estimulação. Em particular, as subclasses IgG1 e IgG3 medeiam ainda funções biológicas protetivas importantes, tais como a fixação do complemento, opsonização e indução de citotoxicidade mediada por células dependente de anticorpos pelas células exterminadoras naturais (NK) (do inglês *Natural Killer Cell*).

Similarmente aos humanos, o murgancho também é caracterizado por ter quatro classes de imunoglobulinas IgG1, IgG2a, IgG2b e IgG3, tendo estas correspondência funcional ao IgG1, IgG2, IgG4 e IgG3 humanos, respetivamente (revisto em Visciano *et al.*, 2012). No geral, conclui-se que o IgG1 nos humanos e nos murganchos (bem como o IgG4 nos humanos) é associado a uma resposta do SI mediada por células Th2 enquanto as restantes subclasses por células Th1.

Como já foi referido anteriormente (seção I.4) ainda não existe um consenso relativamente ao tipo de resposta imunitária que confere proteção à infeção por *H. pylori*. Na infeção por *H. pylori* verifica-se a indução de uma resposta maioritariamente Th1 ao invés de uma resposta Th2. O facto de haver uma carência de uma resposta imune equiponderada entre células Th1 e Th2 é a base de diversos autores defenderem que uma vacina efetiva na erradicação da *H. pylori* deverá induzir, de forma equilibrada, ambos os tipos de resposta imune (Suerbaum & Michetti, 2002; Vajdy *et al.*, 2003; Zhou *et al.*, 2009). No entanto, existem autores que defendem que se deverá induzir apenas uma resposta humoral (Aebischer *et al.*, 2001; Akhiani *et al.*, 2004; Ikewaki *et al.*, 2000) e outros que defendem que a resposta imune celular é necessária para a proteção e erradicação da bactéria (Kamradt *et al.*, 2000; Shi *et al.*, 2005).

Na tabela III.6 constam os títulos de imunoglobulinas G nas amostras de soro.

Tabela III. 6 – Títulos de IgG, IgG1 e IgG2 presentes no soro

| Grupos | Antígenos | Título no soro | | |
|--------|---------------------------------------|----------------|-------|-------|
| | | IgG | IgG1 | IgG2a |
| 1 | pVAX1_6T ⁺ | 800 | >6400 | >6400 |
| 2 | Proteína recombinante 6T ⁺ | >6400 | | |
| 3 | Lisados da estirpe 26695 | 800 | | |
| 4 | Lisados da estirpe J99 | >6400 | | |
| 5 | Lisados da estirpe SS1 | >6400 | | |
| 6 | Lisados da estirpe MONA | 800 | | |
| 7 | Lisados da estirpe 1152 | >6400 | | |

Como é possível constatar na tabela III.6, até ao factor de diluição de 1:6400 não foi possível quantificar todos os títulos. Como tal, com o intuito de se poder analisar os títulos das diferentes amostras optou-se por comparar os valores de absorvância a 490nm obtidos à diluição 1:200 (figura III.10).

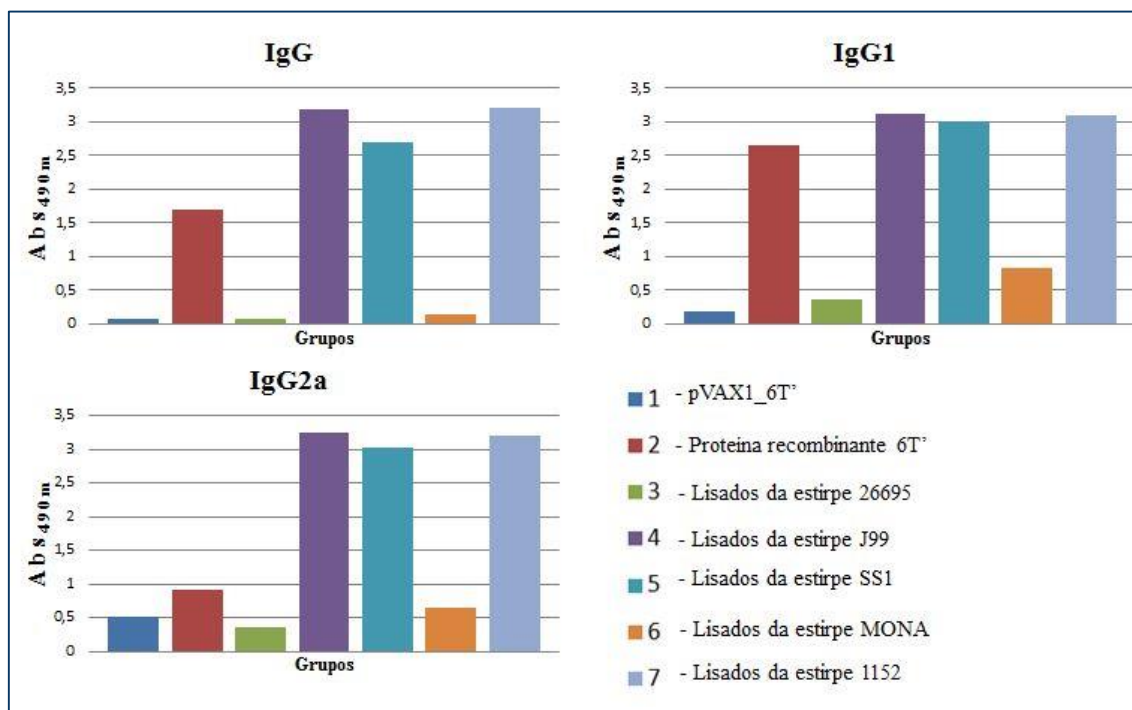


Figura III. 10 – Resposta das subclasses de imunoglobulinas. Valores de absorvância a 490nm e à diluição 1:200 do soro dos diferentes grupos.

Ao analisar-se a figura III.10 é possível verificar que houve uma maior resposta imunitária nos murganhos do grupo 2 comparativamente ao grupo 1. Esta diferença poderá ter por base o facto de a resposta imunitária à construção pVAX1_6T' ser mais lenta, uma vez que o DNA tem que transfetar as células do hospedeiro e aí transcrever a proteína recombinante, enquanto que no caso da administração da proteína recombinante 6T' (grupo 2), esta por si só já se revela intensamente imunogénica. Relativamente à considerável diferença entre o título de IgG1 entre o grupo 1 e 2 tem por base o facto de a proteína recombinante 6T' no grupo 2 estimular maioritariamente uma resposta mediada por células Th2, uma vez que se trata de um antígeno presente no meio extracelular, ao contrário da construção pVAX1_6T', em que a proteína recombinante é expressa no interior das células hospedeiras. No que diz respeito aos restantes grupos é possível verificar que apenas no grupo 3 e 6 é que houve uma resposta imunitária anti-*H. pylori* diminuída comparativamente aos grupos 4, 5 e 7. A diferença da intensidade das respostas imunitárias entre as diferentes estirpes tem a ver com o facto de serem administrados extractos celulares e cada estirpe terá um diferente tipo e quantidade de antígenos extractáveis. Contudo é possível constatar que houve produção de anticorpos, sendo esse um dos objetivos do trabalho de modo a permitir as análises subsequentes de *Western Blot*.

Com o intuito de se analisar se a resposta mediada por células Th1 e Th2 era equilibrada avaliou-se ainda a razão de IgG2a/IgG1 à diluição de 1:200 (figura III.11).

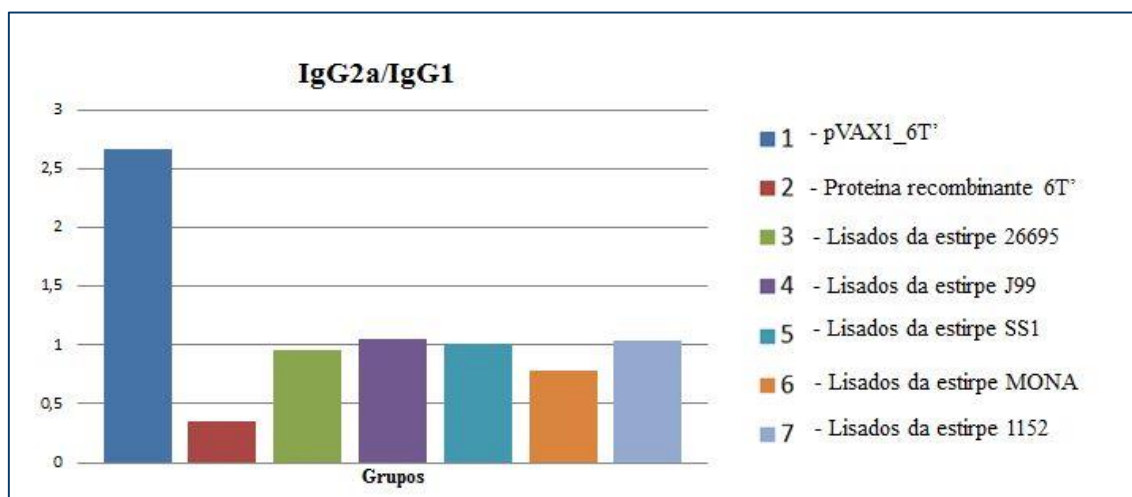


Figura III. 11 – Razão IgG2a/IgG1. Razão calculada a partir dos valores de absorvância, a 490nm para a diluição 1:200, do soro de cada grupo.

Ao analisar-se a figura III.11 verifica-se que no murganho do grupo 1, ao qual se administrou a construção pVAX1_6T', se desenvolveu uma resposta imunitária maioritariamente mediada por células Th1. Este tipo de resposta imunitária era já previsível uma vez que se administrou DNA recombinante que irá ser incorporado pelas células hospedeiras e aí transcrever a proteína recombinante, sendo as proteínas apresentadas às células apresentadoras de antígenos pela via intracelular. Por outro lado, nos murganhos do grupo 2 administrou-se a proteína recombinante 6T' e tal como seria de esperar obter-se uma resposta maioritariamente mediada por células Th2. Relativamente aos grupos aos quais se administrou os lisados proteicos de diferentes estirpes de *H. pylori* (do grupo 3 ao 7), pela análise da figura III.11, verifica-se uma resposta imunitária celular e humoral mais equilibrada, tendo-se uma razão de aproximadamente 1, exceto no grupo 6 em que já se obteve uma razão ligeiramente inferior a 1.

É importante salientar que esta avaliação carece de valores estatísticos relevantes uma vez que só foram utilizados dois murganhos por grupo, por isso todas as análises são apenas um indicativo das amostras em causa, não se podendo extrapolar os resultados obtidos.

3.3.2 Western Blot

Como já foi referido na seção I.1.3 a *H. pylori* é dotada de uma elevada imunovariabilidade. Esta variabilidade tem dificultado a conceção de uma vacina eficaz contra todas as estirpes existentes. Para avaliar esta imunovariabilidade analisou-se por *Western Blot* o padrão de reconhecimento dos anticorpos anti-*H. pylori* 26695 perante lisados de diferentes estirpes de *H. pylori* e das diferentes construções multi-antigénicas elaboradas no Laboratório de Biomédica da FEUCP (figura III.12).

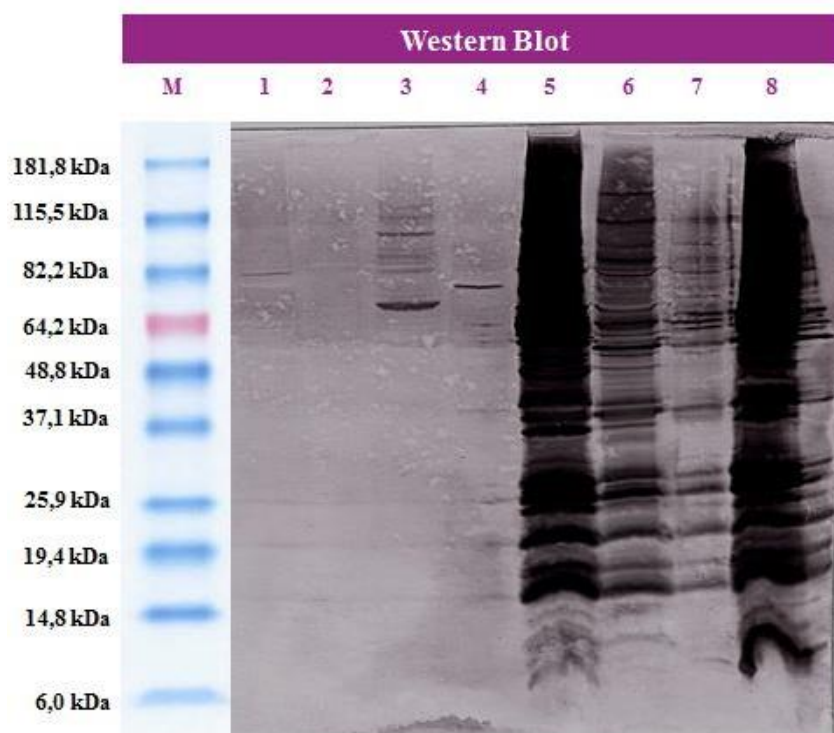


Figura III. 12 –Western Blot da proteína recombinante 6T', 6T, 8T e de lisados de diferentes estirpes de *H. pylori* detectados com anticorpos anti-*H. pylori* 26695. M – marcador de peso molecular pré-corado BenchMarch™; 1 – proteína recombinante 6T'; 2 – proteína recombinante 6T; 3 – proteína recombinante 8T; 4 - lisados da *H. pylori* SS1; 5 – lisados da *H. pylori* J99; 6 – lisados da *H. pylori* 1152/04; 7 – lisados da *H. pylori* MONA; 8 – lisados da *H. pylori* 26695.

Ao comparar-se os resultados obtidos no *Western Blot* para as três construções, nomeadamente a proteína recombinante 6T' e a proteína recombinante 6T (amostra 1 e 2 da figura III.12, respetivamente) observa-se que os anticorpos anti-*H. pylori* 26695 não reconhecem a proteína 6T. Para confirmar este dado dever-se-ia fazer a mesma análise com soro mais concentrado e com uma maior quantidade de proteína 6T. Por outro lado, na amostra 1 (proteína recombinante 6T') é detetada uma banda de aproximadamente 82,2kDa. O facto de a banda correspondente à proteína recombinante 6T' se encontrar na região dos 82,2kDa e não nos 46kDa aproximadamente, como esperado, sugere que a proteína purificada encontra-se na sua forma não solúvel. Os anticorpos anti-*H. pylori* 26695 detetaram também a construção 8T (amostra 3 da figura III.12), observando-se no *Western Blot* uma banda ligeiramente superior a 64,2kDa, correspondendo esta à proteína recombinante 8T , e uma de aproximadamente 115,5kDa que poderá corresponder a uma forma aglomerada da proteína recombinante 8T.

Relativamente ao padrão de reconhecimento dos anticorpos anti-*H. pylori* 26695 dos lisados de diferentes estirpes de *H. pylori* (amostra 4, 5, 6, 7 e 8 da figura III.12) é possível

observar um forte reconhecimento das diferentes estirpes com exceção da amostra 4, que corresponde aos lisados da estirpe SS1, em que apenas é reconhecida uma banda de aproximadamente 82,2kDa. O reconhecimento de apenas uma banda da amostra 4 vem corroborar o que já foi referido anteriormente, nomeadamente a existência de mutações ao nível da região de reconhecimento do anticorpo. Existem diversas proteínas em comum entre a SS1 e a 26695, no entanto apenas uma é reconhecida pelos anticorpos anti-*H. pylori* 26695, o que poderá ser reflexo da existência de mutações nas proteínas da SS1 não sendo então reconhecidas pelos anticorpos. No entanto esta diferença também poderá resultar de haver uma menor quantidade de proteína presente na amostra. Há ainda que ter em consideração que os lisados das diferentes estirpes são provenientes do crescimento das estirpes *in vitro* e cerca de 4-7% dos genes expressos no estômago não são expressos em culturas *in vitro* (Graham *et al.*, 2002). Como tal, nos lisados das diferentes estirpes, poderão não estar presentes todas as proteínas expressas na infeção natural, o que condiciona os resultados obtidos no *Western Blot*. Para ter uma melhor análise da variabilidade entre estirpes dever-se-ia ter efetuado o mesmo procedimento para todas as estirpes que foram cultivadas. De acordo com o teoricamente esperado, os lisados que demonstraram uma maior intensidade de reconhecimento foi o da amostra 8, que corresponde aos lisados da estirpe 26695. A estirpe J99 (amostra 5) foi também fortemente reconhecida pelos anticorpos anti-*H. pylori* 26695.

É a elevada variabilidade entre as diferentes estirpes e mutações nas regiões de reconhecimento dos anticorpos que corroboram a necessidade de se construir uma vacina multi-antigénica, com o intuito de aumentar a probabilidade de a *H. pylori* ser detetada e promover-se a sua erradicação. Com uma proteína recombinante multi-antigénica é possível desencadear uma resposta imunitária direcionada para diferentes antigénios, potencializando assim a eficácia da vacina. A proteína recombinante 6T' é constituída por epítomos de 6 proteínas da *H. pylori*, como já foi referido anteriormente. Idealmente a proteína recombinante 6T' irá então desencadear uma resposta imunitária específica para os 6 epítomos, permitindo a deteção das respetivas proteínas na presença da infeção por *H. pylori*.

Com o intuito de analisar o padrão de reconhecimento dos anticorpos anti-6T' produzidos em murganhos efetuou-se uma SDS-PAGE dos lisados de diferentes estirpes de *H. pylori* (rever tabela III.4), seguido de um *Western Blot*. A partir da base de dados da NCBI foi possível obter as sequências das proteínas correspondentes aos antigénios presentes na construção 6T' e recorrendo à ferramenta *Sequence Manipulation Suite* disponível online foi possível determinar o peso molecular das respetivas proteínas (Tabela III.7).

Tabela III. 7 – Peso molecular das 6 proteínas alvo: CagA, VacA, UreB, HpaA, NapA e HomB.

| Estirpe | Proteína | Peso molecular (kDa) |
|---------|----------|----------------------|
| 26695 | CagA | 102,87 |
| | VacA | 139,33 |
| | UreB | 61,69 |
| | HpaA | 29,05 |
| | NapA | 16,94 |
| J99 | CagA | 129,75 |
| | VacA | 139,15 |
| | UreB | 61,69 |
| | HpaA | 29,20 |
| | NapA | 16,84 |
| H-9 | HomB | 73,63 |

Teve-se por base os valores da tabela III.7 para a identificação nos *Western Blot* das bandas proteicas das diferentes estirpes reconhecidas pelos anticorpos anti-6T' (figura III.13 e III.14).

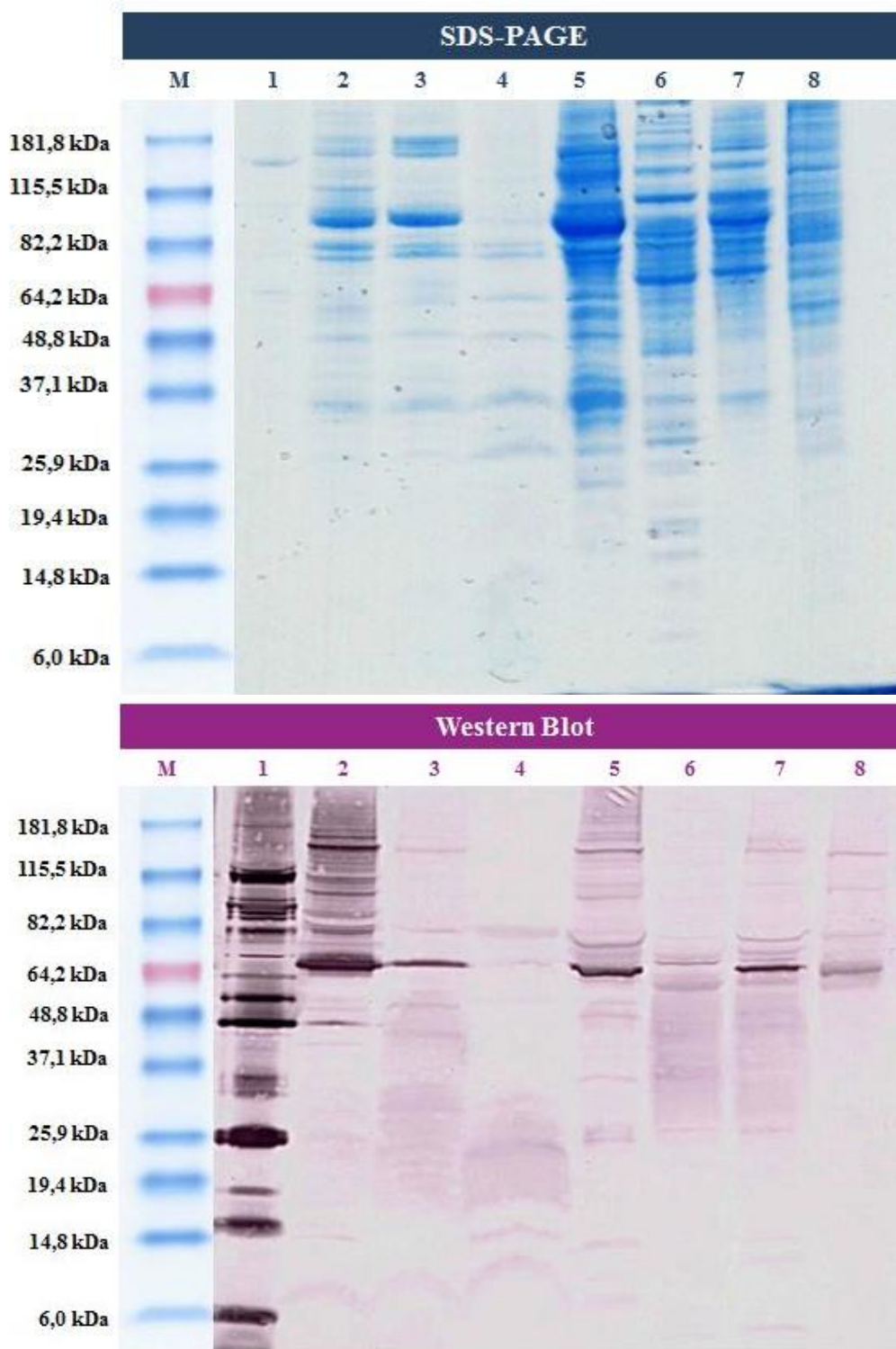


Figura III. 13 - SDS-PAGE após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e Western Blot da proteína recombinante 6T' e de lisados de diferentes estirpes detectados com anticorpos anti-6T'. A imagem de SDS-PAGE representada é após a transferência das proteínas, sendo um controle da transferência das proteínas. M – marcador de peso molecular pré-corado BenchMarch™; 1 – proteína recombinante 6T'; 2 – lisados da *H. pylori* B23/99; 3 – lisados da *H. pylori* 26695; 4 – lisados da *H. pylori* J99; 5 – lisados da *H. pylori* 499/02; 6 – lisados da *H. pylori* 1198/04; 7 – lisados da *H. pylori* MONA; 8 – lisados da *H. pylori* 583.

Ao analisar-se a amostra 1 da figura III.13, nomeadamente o resultado do *Western Blot*, observa-se a existência de uma banda de aproximadamente 48,8kDa, correspondendo esta banda à proteína recombinante 6T' (45,59kDa). É ainda visível uma banda de aproximadamente 115,5kDa, que poderá corresponder à fração insolúvel da proteína recombinante 6T'. As restantes bandas na amostra 1 poderão ser contaminantes da *E. coli*, sugerindo assim que a proteína usada nas imunizações não estaria devidamente purificada, ou poderão resultar de hidrólises da proteína recombinante 6T'.

Relativamente aos resultados obtidos no *Western Blot* para as restantes amostras (lisados de estirpes de *H. pylori*), nomeadamente da amostra 2 à amostra 8 (figura III.13), observa-se uma banda comum a todas de aproximadamente a 64,2kDa, tendo um sinal mais intenso para a amostra 2, 3, 5 e 7. Esta banda poderá corresponder à proteína UreB, observando-se assim que o epítipo da ureB presente na construção 6T' produz anticorpos capazes de reconhecer a UreB de diferentes estirpes de *H. pylori*. Relativamente à proteína NapA (\approx 17kDa, de acordo com os dados da tabela III.7) não foi possível detetar uma banda nítida correspondente a esta proteína, no entanto na amostra 3 e 4 observa-se um arrastão onde deveria aparecer a banda correspondente à NapA. Na amostra 5 observa-se uma banda ténue ligeiramente abaixo da banda do marcador de peso molecular de 37,1kDa. Esta banda poderá corresponder a um dímero da proteína NapA. Esta banda é também nitidamente visível na imagem de SDS-PAGE após a transferência das proteínas na figura III.13, nas amostras de 2 a 7, o que poderá sugerir que a ausência de sinal desta banda no *Western Blot* poderá dever-se ao facto de as proteínas não terem sido transferidas na sua totalidade. Nas amostras 4, 5, 6 e 7 é possível observar uma banda pouco intensa de aproximadamente 25,9kDa, sugerindo que esta banda corresponde à proteína HpaA (\approx 29kDa, de acordo com os dados da tabela III.7). Observando a região de aproximadamente 82,2kDa é também possível visualizar uma banda ténue em todas as amostras de 2 a 8, podendo estas corresponder à proteína HomB. Abaixo da banda do marcador de peso molecular correspondente a 115,5kDa é possível observar uma banda ténue nas amostras 2,5,7 e 8, podendo esta banda corresponder à proteína CagA. Nas amostras 2, 3 e 6 não se observa a banda correspondente à CagA mas não implica que seja devido ao anticorpo não reconhecer a proteína, uma vez que apesar de as correspondentes estirpes terem o gene *cagA* não implica que este seja expresso. É ainda possível observar nos resultados de *Western Blot* (figura III.13) uma banda entre 115,5kDa e 181,8kDa nas amostras 2, 3, 5, 7 e 8, sendo mais intensa na amostra 2 que poderá corresponder à VacA. Tal como foi referido relativamente à CagA, o facto de nas amostras 4 e 6 não se detetar a banda correspondente à VacA poderá dever-se a esta proteína não ser expressa nessas estirpes, uma vez que apesar de o gene *vacA* estar presente em todas as estirpes de *H. pylori* apenas é

expresso em cerca de 50-60% das estirpes (Lima & Rabenhorst, 2009; Müller *et al.*, 2002). Observa-se ainda mais bandas nas amostras de 2 a 8 que não foram possíveis de identificar, que poderão corresponder a proteínas alvo que estejam aglomeradas ou hidrolisadas.

É de salientar que a intensidade de reconhecimento não é diretamente comparável entre as amostras uma vez que estas não foram normalizadas em relação ao teor de proteína usado em cada amostra. Há ainda que ter em conta que nem todas as proteínas foram devidamente transferidas do gel de poliacrilamida para a membrana de transferência PVDF, como é possível observar na SDS-PAGE da figura III.13, influenciando assim as bandas obtidas no *Western Blot* apresentado na mesma figura.

Uma vez que se analisou o padrão de reconhecimento dos anticorpos anti-6T' para 15 estirpes de *H. pylori* diferentes foi necessário efetuar dois *Western Blot*. Na figura III.14 constam os resultados da SDS-PAGE e *Western Blot* para as restantes 8 estirpes, para além das já ilustradas na figura III.13. Para este segundo ensaio, contrariamente aos anteriores, todas as amostras foram normalizadas, para que todas as amostras apresentassem uma concentração proteica de 20µg.

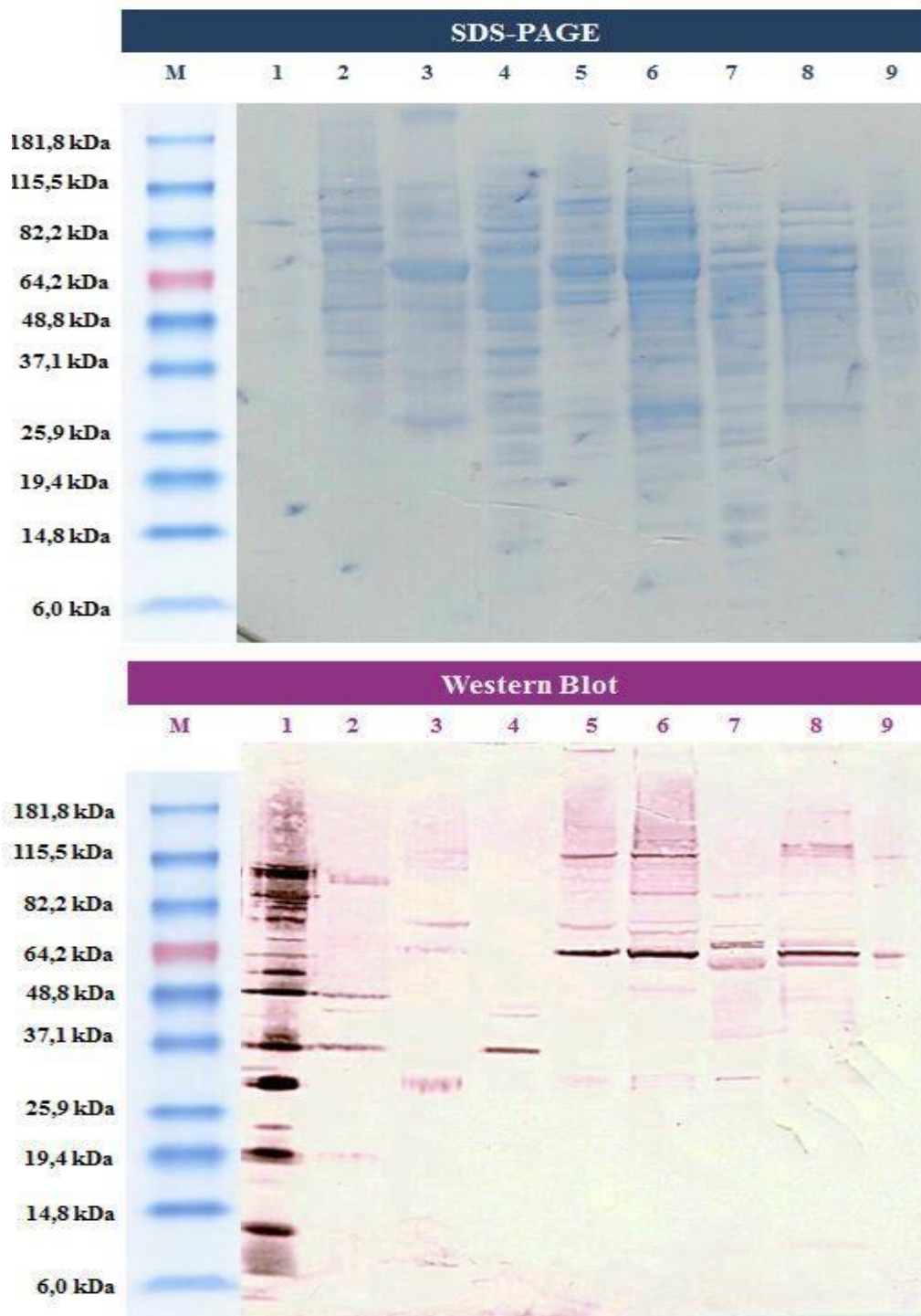


Figura III. 14 - SDS-PAGE após transferência das proteínas para a membrana de nitrocelulose e Western Blot da proteína recombinante 6T' e de lisados de diferentes estirpes detectados com anticorpos anti-6T'. A imagem de SDS-PAGE representada é após a transferência das proteínas, sendo um controle da transferência das proteínas. M – marcador de peso molecular pré-corado BenchMarch™; 1 – proteína recombinante 6T'; 2 – lisados da *H. pylori* 173/00; 3 – lisados da *H. pylori* A3/90; 4 – lisados da *H. pylori* SS1; 5 – lisados da *H. pylori* EN32; 6 – lisados da *H. pylori* 655/99; 7 – lisados da *H. pylori* Mex 288; 8 – lisados da *H. pylori* Arg 54; 9 – lisados da *H. pylori* 1152/04.

Ao analisar-se a amostra 1 da figura III.14, nomeadamente o resultado do *Western Blot*, observa-se a banda correspondente à proteína recombinante 6T' (45,59kDa) e outra banda correspondente à fração insolúvel da proteína recombinante 6T' próxima dos 115,5kDa. As restantes bandas na amostra 1 são ou proteínas da *E. coli* ou resultado de hidrólises da proteína, tal como já foi referido anteriormente na figura III.13.

Pela análise dos resultados de *Western Blot* (figura III.14) da amostra 2 até à amostra 9 observa-se que a banda detetada com maior frequência entre as diferentes estirpes tem aproximadamente 64,2kDa, não sendo apenas detetada na amostra 2 e 4, podendo esta banda corresponder à proteína UreB, de acordo com os valores de peso molecular indicados na tabela III.7. Próximo da banda do marcador de peso molecular correspondente a 115,5kDa é possível observar uma banda ténue em todas as amostras exceto na 4 e na 7, sugerindo-se que esta banda corresponde à proteína CagA. No entanto, segundo as informações de cada estirpe que constam na tabela II.2 as estirpes correspondentes aos lisados da amostra 2 e da amostra 6 não possuem o gene *cagA*. Como tal a banda nos 115,5kDa presentes nestas duas amostras corresponderá a outra proteína. Há ainda outra banda que é detetada na maioria das estirpes, exceto na amostra 2, 4 e 9, ligeiramente abaixo dos 82,2kDa, mas com uma menor intensidade de sinal comparativamente à UreB. O peso molecular associado a esta banda sugere que seja a proteína HomB. No entanto, ao analisar-se o SDS-PAGE após a transferência das proteínas (figura III.14) esta banda é visível na amostra 2 e 3, podendo então a ausência de sinal no *Western Blot* ser devido à não transferência total da proteína em causa. Relativamente à NapA, tal como na figura III.13, não foi possível detetar a respetiva banda. No entanto, nas amostras 2 e 4 é possível ver uma banda de aproximadamente 37,1kDa, que poderá corresponder ao dímero da napA. Ligeiramente superior à banda de 25,9kDa do marcador de peso molecular observa-se uma banda ténue na amostra 3, 5, 6 e 7, sugerindo que esta banda corresponde à proteína HpaA. Relativamente à proteína VacA é apenas detetada uma banda na amostra 8 que sugere corresponder a esta proteína, localizando-se na parte superior da banda do marcador de 115,5kDa. Observa-se ainda mais bandas nas amostras de 2 a 9 que não foram possíveis de identificar. É de salientar que nem todas as proteínas poderão ter sido devidamente transferidas do gel de poliacrilamida para a membrana.

Pela análise das figuras III.13 e III.14 é então possível observar que os anticorpos anti-6T' reconhecem todas as estirpes, sendo que numas reconhecem mais proteínas que noutras mas o importante neste estudo era que os anticorpos anti-6T' abrangessem todas as estirpes. Observa-se ainda que a proteína UreB foi a mais reconhecida entre as diferentes estirpes e também a reconhecida com uma maior intensidade, o que seria de prever uma vez que a urease

representa cerca de 5-10% do proteoma da *H. pylori* (revisto em Kusters *et al.*, 2006). Relativamente às proteínas alvo da construção 6T' que nem sempre foram identificadas sugere que estas proteínas estão sujeitas a mutações na região de reconhecimento dos anticorpos anti-6T'. Como tal dever-se-á avaliar a existência de epítomos destas proteínas que sejam mais apropriados, ou seja, que sejam alvos de uma baixa ou idealmente nula taxa de mutação. Um ensaio que poderá ser efetuado para a determinação de epítomos candidatos poderá consistir na construção de vários péptidos de cada proteína e incubá-los com o soro de pacientes infetados com diferentes estirpes de *H. pylori*, determinando-se assim o epítopo mais conservado e imunogénico, como foi feito por Yang *et al.* (2013) relativamente à UreB.

CAPÍTULO IV – CONCLUSÕES E PERSPETIVAS FUTURAS

A *H. pylori* é um agente patogénico que se encontra associados a diversas doenças gástricas, algumas delas letais como o CG, e que abrange uma elevada porção da população mundial. O facto de esta bactéria contribuir para o decréscimo da saúde mundial torna-a num alvo a combater.

Atualmente existem métodos de diagnóstico fiáveis e bem implementados, como é o caso dos métodos invasivos baseados em biologia molecular. No entanto, o diagnóstico é maioritariamente realizado recorrendo às técnicas não invasivas, de modo a evitar sujeitar o paciente a métodos incómodos. No entanto os métodos não invasivos carecem de sensibilidade e especificidade, como é o caso dos métodos de diagnóstico sorológicos e a fezes. O melhoramento destas técnicas poderá ser alcançado a partir da seleção de um conjunto de antígenos conservados entre as diferentes estirpes. A robustez do diagnóstico será amplificada ao usar-se diferentes anticorpos específicos para diferentes antígenos, ao invés de se basear apenas na deteção com um tipo de anticorpo.

Hoje em dia a única terapia existente para o tratamento da infeção da *H. pylori* consiste na combinação de antibióticos com um inibidor de bomba de prótons. No entanto este tipo de terapia tem associados diversos problemas, tais como não evitar a re-infeção e o desenvolvimento de resistência a antibióticos. A necessidade de conceber uma vacina contra a *H. pylori* torna-se então evidente perante o constante aumento da ineficácia da terapia baseada em antibióticos, podendo esta ser a melhor abordagem para a erradicação desta bactéria e para prevenir novas infeções.

Ao longo dos anos a *H. pylori* tem sido um alvo de uma investigação extensa, no entanto ainda não foi possível entender qual é o tipo de imunidade eficiente na erradicação da *H. pylori*. Já se efetuaram diversos estudos de possíveis vacinas contra a *H. pylori*, no entanto nestes estudos observou-se apenas uma diminuição da colonização da bactéria e não a erradicação eficiente desta. Um dos motivos que poderá estar a limitar a eficácia das vacinas contra a bactéria poderá consistir numa carência ao nível da seleção de antígenos. Uma vez que esta bactéria tem associada uma elevada variabilidade surge a necessidade de selecionar um conjunto robusto de antígenos que garantam a eficácia de uma vacina. É neste âmbito que uma

vacina multi-antigénica surge como uma estratégia possível para contornar o problema associado à variabilidade associada a esta bactéria.

Neste trabalho foi então aperfeiçoada uma vacina multi-antigénica previamente construída, substituindo-se um dos seis antigénios constituintes desta, nomeadamente o epítopo da GroEL por um da NapA. A substituição do epítopo da GroEL teve por base o facto de haver o risco de se desenvolverem doenças auto-imunes, devido à reatividade com proteínas humanas homólogas. Por outro lado a NapA é considerada um dos maiores antigénios da *H. pylori* e revela ter um papel importante na colonização da bactéria, sendo então um potencial candidato para uma vacina. O epítopo da NapA era constituinte de uma outra construção previamente elaborada no Laboratório de Biomédica da FEUCP e foi clonado no plasmídeo pUC57. Pela digestão com enzimas de restrição foi possível retirar o epítopo da GroEL e adicionar o epítopo da NapA por ligação com a enzima ligase. Os epítopos seleccionados foram clonados em dois vetores plasmídicos diferentes, nomeadamente o pVAX1 e o pQE30, de modo a ser possível a expressão da proteína recombinante tanto em células eucarióticas como procariotas, respetivamente. Deste modo obteve-se a formulação de uma vacina de DNA e de uma vacina proteica. Para a construção da vacina baseada na proteína recombinante a confirmação da construção do plasmídeo foi realizada através de um mapa de restrição e pela produção da proteína em *E. coli*. A confirmação da presença dos 6 epítopos e expressão da proteína recombinante, para a construção de DNA, foi efetuada por mapa de restrição e transfeção de células HEK 293T, respetivamente.

Para analisar a capacidade das duas construções, DNA recombinante e de proteína recombinante, desencadear uma resposta imunitária específica procedeu-se à imunização de murganhos. Da análise dos títulos dos anticorpos específicos IgG, IgG1 e IgG2a nos soros dos murganhos observou-se a produção de resposta imunitária específica para o DNA recombinante 6T' e para a proteína recombinante 6T'. Observou-se um maior título de anticorpos produzidos aquando da imunização com a proteína recombinante, uma vez que não se utilizou nenhum processo para promover a transfecção *in vivo* do plasmídeo da vacina de DNA.

A análise do padrão de reconhecimento dos anticorpos anti-6T' perante diferentes estirpes de *H. pylori* foi efetuada através da separação dos extratos proteicos das diferentes estirpes por SDS-PAGE seguido de *Western Blot* com os anticorpos anti-6T'. Nesta análise observou-se que os anticorpos anti-6T' reconheceram todas as estirpes obtidas de diferentes partes do globo. Idealmente os anticorpos anti-6T' deveriam reconhecer as 6 proteínas CagA, VacA, UreB, NapA, HpaA e HomB, cujos epítopos constituem a vacina mas tal não se observou, devido provavelmente à não expressão de alguns destes alvos ou devido à

imunovariabilidade destes alvos nas diferentes estirpes. Futuramente poder-se-á analisar se os epítomos selecionados foram os ideais e se não existem epítomos mais apropriados. Para tal análise poder-se-á fazer um ensaio que consiste na construção de vários péptidos de cada proteína e incubá-los com o soro de pacientes infetados com diferentes estirpes de *H. pylori*, determinando-se assim o epítomo mais conservado e imunogénico, como foi feito por Yang *et al.* (2013) relativamente à UreB. Há ainda que ter em consideração que as proteínas da *H. pylori* foram expressas *in vitro*, podendo então não ser expressas todas as proteínas, influenciando os resultados obtidos (Graham *et al.*, 2002).

Os resultados obtidos neste trabalho corroboram a necessidade de uma vacina multi-antigénica, de modo a contornar a imunovariabilidade das proteínas da *H. pylori*. Com uma vacina multi-antigénica aumenta-se a probabilidade de reconhecer qualquer tipo de estirpe de *H. pylori* e promover a sua erradicação. Num estudo futuro dever-se-ia utilizar um maior número de estirpes.

Posteriormente a este trabalho, poderia ser interessante efetuar um estudo de otimização das construções elaboradas, nomeadamente ao nível da adição de adjuvantes e um estudo de vacinação em modelos animais com a vacina de DNA recombinante 6T' e a vacina da proteína recombinante 6T', com o intuito de avaliar a eficácia da construção na erradicação *in vivo* da *H. pylori*. No estudo de vacinação seria interessante avaliar os seguintes parâmetros: via de administração, dose a administrar e o efeito da vacina antes e após infeção com *H. pylori*.

Por fim, o facto de os alvos selecionados serem específicos da *H. pylori* e de os anticorpos específicos anti-6T' serem capazes de detetar proteínas em diferentes estirpes, como foi observado nos resultados de *Western Blot*, seria interessante analisar a empregabilidades destes alvos em métodos sorológicos de diagnóstico da infeção, com o intuito de aperfeiçoar este tipo de diagnóstico, diminuindo assim os resultados falsos negativos e falsos positivos.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Aebischer T., Laforsch S., Hurwitz R., Brombacher F. & Meyer T. F. (2001). Immunity against *Helicobacter pylori*: significance of interleukin-4 receptor α chain status and gender of infected mice. *Infection and Immunity* 69: 556-558.
- Akhiani A. A., Schon K., Franzen L. E., Pappo J. & Lycke N. (2004). *Helicobacter pylori*-specific antibodies impair the development of gastritis, facilitate bacterial colonization, and counteract resistance against infection. *Journal of Immunology* 172: 5024-5033.
- Argent R. H., Thomas R. J., Letley D. P., Rittig M. G., Hardie K. R. & Atherton J. C. (2008). Functional association between the *Helicobacter pylori* virulence factors VacA and CagA. *Journal of Medical Microbiology* 57: 145–150.
- Arnau J., Lauritzen C., Petersen G. E. & Pedersen J. (2011). Reprint of: Current strategies for the use of affinity tags and tag removal for the purification of recombinant proteins. *Protein Expression and Purification* 48: 1-13.
- Azevedo N. F., Guimarães N., Figueiredo C., Keevil C. W. & Vieira M. J. (2007). A new model for the transmission of *Helicobacter pylori*: Role of environmental reservoirs as gene pools to increase strain diversity. *Critical Reviews in Microbiology* 33 (3): 157-169.
- Azevedo N. F., Huntington J. & Goodman K. J. (2009). The Epidemiology of *Helicobacter pylori* and Public Health Implications. *Helicobacter* 14 (1): 1-7.
- Bamford K. B., Fan X., Crowe S. E., Leary J. F., Gourley W. K., Luthra G. K., Brooks E. G., Graham D. Y., Reyes V. E. & Ernst P. B. (1998). Lymphocytes in the human gastric mucosa during *Helicobacter pylori* have a T helper cell 1 phenotype. *Gastroenterology* 114: 482-492.
- Bauer B. & Meyer T. F. (2011). The human gastric pathogen *Helicobacter pylori* and its association with gastric cancer and ulcer disease. *Ulcers*: 15 páginas.
- Blaser M. J. (1999). Hypothesis: the changing relationships of *Helicobacter pylori* and humans: implications for health and disease. *The Journal of Infectious Diseases* 179: 1523–1530.
- Brown L. M. (2000). *Helicobacter pylori*: Epidemiology and Routes of Transmission. *Epidemiologic Reviews* 22: 283-297.

- Carlsohn E., Nystrom J., Bolin I., Nilsson C. L. & Svennerholm A. M. (2006). HpaA Is Essential for *Helicobacter pylori* Colonization in Mice. *Infection and Immunity* 74: 920–926.
- Censini S., Lange C., Xiang Z., Crabtree J. E., Ghiara P., Borodovsky M., Rappuoli R. & Covacci A. (1996). cag, a pathogenicity island of *Helicobacter pylori*, encodes type I-specific and disease-associated virulence factors. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 14648–14653.
- Chen Y. & Blaser M. J. (2007). Inverse associations of *Helicobacter pylori* with asthma and allergy. *Archives of Internal Medicine* 167: 821 - 827.
- Chen Y. & Blaser M. J. (2008). *Helicobacter pylori* colonization is inversely associated with childhood asthma. *The Journal of Infectious Diseases* 198: 553–560.
- Chen B. Y. & Janes H. W. (2002). Methods in Molecular Biology: PCR cloning Protocols. *Humana Press Inc.* volume 192: 111-112.
- Ching C. K., Wong B. C., Kwok E., Ong L., Covacci A. & Lam S. K. (1996). Prevalence of CagA-bearing *Helicobacter pylori* strains detected by the anti-CagA assay in patients with peptic ulcer disease and in controls. *The American Journal of Gastroenterology* 91: 949–953.
- Chuang M. H., Wu M. S., Lo W. L., Lin J. T., Wong C. H. & Chiu S. H. (2006). The Antioxidant Protein Alkylhydroperoxide Reductase of *Helicobacter pylori* Switches from a Peroxide Reductase to a Molecular Chaperone Function. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 103: 2552-2557.
- Chui S. Y., Clay T. M., Lyerly H. K. & Morse M. A. (2005). The Development of Therapeutic and Preventive Vaccines for Gastric Cancer and *Helicobacter pylori*. *Cancer Epidemiology Biomarkers Prevention* 14:1883-1889.
- Cirak M. Y., Akyon Y. & Mégraud F. (2007). Diagnosis of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 12: 4-9.
- Cooke C. L., Huff J. L. & Solnick J. V. (2005). The role of genome diversity and immune evasion in persistent infection with *Helicobacter pylori*. *FEMS Immunology and Medical Microbiology* 45: 11-23.
- Covacci A. & Rappuoli R. (2003). *Helicobacter pylori*: After the Genomes, Back to Biology. *The Journal of Experimental Medicine* 197: 807–811.

- Covacci A., Censini S., Bugnoli M., Petracca R., Burroni D., Macchia G., Massone A., Papini E., Xiang Z., Figura N. & Rappuoli R. (1993). Molecular characterization of the 128-kDa immunodominant antigen of *Helicobacter pylori* associated with cytotoxicity and duodenal ulcer. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 90: 5791–5795.
- Cover T. L. & Blanke S. R. (2005). *Helicobacter pylori* VacA, a paradigm for toxin multifunctionality. *Nature Reviews Microbiology* 3: 320–332.
- Cover T. L. & Blaser M. J. (2009). *Helicobacter pylori* in Health and Disease. *Gastroenterology* 136: 1863-1873.
- Cover T. L., Glupczynski Y., Lage A. P., Burette A., Tummuru M. K., Perez-Perez G. I. & Blaser M. J. (1995). Serologic detection of infection with cagA *Helicobacter pylori* strains. *Journal of Clinical Microbiology* 33: 1496–1500.
- Cover T. L., Krishna U. S., Israel D. A. & Peek R. M. (2003). Induction of gastric epithelial cell apoptosis by *Helicobacter pylori* vacuolating cytotoxin. *Cancer Research* 63: 951–957.
- Dossumbekova A., Prinz C., Gerhard M., Brenner L., Backert S., Kusters J. G., Schmid R. M. & Rad R. (2006). *Helicobacter pylori* outer membrane proteins and gastric inflammation. *Gut* 55: 1360.
- Every A. L. (2013). Key host-pathogen interactions for designing novel interventions against *Helicobacter pylori*. *Trends in Microbiology* 21 (5): 253-259.
- Figueiredo L., Cadete A., Goncalves L. M., Corvo M. L. & Almeida A. J. (2012). Intranasal immunisation of mice against *Streptococcus equi* using positively charged nanoparticulate carrier systems. *Vaccine*.
- Flach C. F., Svensson N., Blomquist M., Ekman A., Raghavan S. & Homgren J. (2011). A truncated form of HapA is a promising antigen for use in vaccine against *Helicobacter pylori*. *Vaccine* 29: 1235-1241.
- Ford A. C. & Axon A. T. R. (2010). Epidemiology of *Helicobacter pylori* Infection and Public Health Implications. *Helicobacter* 15 (1): 1-6.
- Frenck R. W. & Clemens J. (2003). *Helicobacter* in the developing world. *Microbes and Infection* 4: 705-713.

- Fujimoto S., Olaniyi O. O., Arnqvist A., Wu J. Y., Odenbreit S., Haas R., Graham D. Y. & Yamaoka Y. (2007). *Helicobacter pylori* BabA expression, gastric mucosal injury, and clinical outcome. *Clinical Gastroenterology and Hepatology* 5: 49-58.
- Gerhard M., Lehn N., Neumayer N., Borén T., Rad R., Schepp W., Miehke S., Classen M. & Prinz C. (1999). Clinical relevance of the *Helicobacter pylori* gene for blood-group antigen binding adhesin. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 12778–12783.
- Gisbert J. P., González L., X. Calvet, N. Garcia, T. López, M. Roqué, R. Gabriel & J. M. Pajares. (2000). Proton pump inhibitor, clarithromycin and either amoxicillin or nitroimidazole: a meta-analysis of eradication of *Helicobacter pylori*. *Alimentary Pharmacology and Therapeutics* 14: 1319–1328.
- Gisbert J. P., Pajares R. & Pajares J. M. (2007). Evolution of *Helicobacter pylori* therapy from a meta-analytical perspective. *Helicobacter* 12: 50–58.
- Gottwein, J. M., Blanchard T. G., Targoni O. S., Eisenberg J. C., Zagorski B. M., Redline R. W., Nedrud J. G., Tary-Lehmann M., Lehmann P. V. & Czinn S. J. (2001). Protective anti-*Helicobacter* immunity is induced with aluminum hydroxide or complete Freund's adjuvant by systemic immunization. *The Journal of Infectious Diseases* 184: 308-314.
- Graham D. Y. & Fischbach L.A. (2011). Empiric therapies for *Helicobacter pylori* infections. *Canadian Medical Association* 183: E506-E508.
- Graham D. Y. & Shiotani A. (2008). New concepts of resistance in the treatment of *Helicobacter pylori* infections. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 5: 321–31.
- Graham J. E., Peek R. M., Krishna U. & Cover T. L. (2002). Global Analysis of *Helicobacter pylori* Gene Expression in Human Gastric Mucosa. *Gastroenterology* 123: 1637-1648.
- Guarner J., Kalach N., Elitsur Y. & Koletzko S. (2010). *Helicobacter pylori* diagnostic tests in children: review of the literature from 1999 to 2009. *European Journal of Pediatrics* 169: 15-25.
- Guo L., Li X., Tang F., He Y., Xing Y., Deng X. & Xi T. (2012). Immunological features and the ability of inhibitory effects on enzymatic activity of an epitope vaccine composed of cholera toxin B subunit and B cell epitope from *Helicobacter pylori* urease A subunit. *Applied Microbiology and Biotechnology* 93: 1937-1945.

- Guo L., Liu K., Zhao W., Li X., Li T., Tang F., Zhang R., Wu W. & Xi T. (2013). Immunological features and efficacy of the reconstructed epitope vaccine CtUBE against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Applied Microbiology and Biotechnology* 97: 2367-2378
- Haas G., Karaali G., Ebermayer K., Metzger W. G, Lamer S., Zimny-Arndt U., Diescher S., Goebel U. B., Vogt K., Roznowski A. B., Wiedenmann B. J., Meyer T. F., Aebischer T. & Jungblut P. R. (2002). Immunoproteomics of *Helicobacter pylori* infection and relation to gastric cancer. *Proteomics* 2: 313-324.
- Huang C.-H., Chuang M.-H., Lo W.-L., Wu M.-S., Wu Y.-H., Wu D.-C. & Chiou S.-H. (2011). Alkylhydroperoxide reductase of *Helicobacter pylori* as a biomarker for gastric patients with diferente pathological manifestations. *Biochimie* 93: 1115-1123.
- Hung I. F. N. & Wong B. C. Y. (2009). Assessing the risks and benefits of treating *Helicobacter pylori* infection. *Therapeutic Advances in Gastroenterology* 2 (3): 141–147.
- Ikewaki J, Nishizono A., Goto T., Fujioka T. & Mifune K. (2000). Therapeutic oral vaccination induces mucosal immune response sufficient to eliminate long-term *Helicobacter pylori* infection. *Microbiology Immunology* 44: 29–39.
- Ilver D., Arnqvist A., Ogren J., Frick I. M., Kersulyte D., Incecik E. T., Berg D. E., Covacci A., Engstrand L. & Boren T. (1998). *Helicobacter pylori* adhesin binding fucosylated histo-blood group antigens revealed by retagging. *Science* 279: 373–377.
- Ilver D., Barone S., Mercati D., Lupetti P. & Telford J. L. (2004). *Helicobacter pylori* toxin VacA is transferred to host cells via a novel contact-dependent mechanism. *Cellular Microbiology* 6: 167–174.
- Josenhans C., Labigne A. & Suerbaum S. (1995). Comparative ultrastructural and functional studies of *Helicobacter pylori* and *Helicobacter mustelae* flagellin mutants: both flagellin subunits, FlaA and FlaB, are necessary for full motility in *Helicobacter* species. *Journal of Bacteriology* 177: 3010-20.
- Kamradt A. E., Greiner M., Ghiara P. & Kaufmann S. H. (2000). *Helicobacter pylori* infection in wild-type and cytokine-deficient C57BL/6 and BALB/c mouse mutants. *Microbes Infection* 2: 593–597.

- Kang J., Jones K. R., Jang S., Olsen C. H., Yoo Y.-J., Merrel S. & Cha J.-H. (2012). The Geographic Origin of *Helicobacter pylori* Influences the Association of the homB Gene with Gastric Cancer. *Journal of Clinical Microbiology* 50 (3): 1082-1085.
- Kimmel B., Bosserhoff A., Frank R., Gross R., Goebel W. & Beier D. (2000). Identification of Immunodominant Antigens from *Helicobacter pylori* and Evaluation of Their Reactivities with Sera from Patients with Different Gastroduodenal Pathologies. *Infection and Immunity* 68: 915-920.
- Koch M., Meyer T. F. & Moss S. F. (2013). Inflammation, Immunity, Vaccines for *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 18 (1): 18-23.
- Kountouras J., Zavos C., Deretzi G., Gavalas E., Chatzopoulos D., Katsinelos P., Tsiaousi E., Gagalis S., Polyzos S. A. & Venizelos. (2012). Potencial implications of *Helicobacter pylori*-related neutrophil-activating protein. *World Journal of Gastroenterology* 18: 489-490.
- Kozak K., Larka C., Nickol A. & Yi A. (1997). Detection of *H. pylori* antigen in stool specimens using a novel enzyme immunoassay. 97th General Meeting of the American Society of Microbiology (abst. C271).
- Krah A., Miehke S., Pleissner K.-P., Zimny-Arndt U., Kirsch C., Lehn N., Meyer T. F., Jungblut P. R. & Aebischer T. (2004). Identification of candidate antigens for serologic detection of *Helicobacter pylori*-infected patients with gastric carcinoma. *International Journal of Cancer* 108: 456-463.
- Krieg R. C., Dong Y., Schwamborn K. & Knuechel R. (2005). Protein quantification and its tolerance for different interfering reagents using the BCA-method with regard to 2D SDS PAGE. *J Biochem Biophys Methods* 65: 13-19.
- Kusters J. G., van Vliet A. H. m. & Kuipers E. J. (2006). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Clinical Microbiology Reviews* 19: 449-490.
- Leal Y. A., Flores L. L., Fuentes-Pananá E. M., Cedillo-Rivera R & Torres J. (2011). 13C-Urea Breath Test for the Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection in Children: A Systematic Review and Meta-Analysis. *Helicobacter* 16: 327-337.
- Letley D. P., Rhead J. L., Twells R. J., Dove B. & Atherton J. C. (2003). Determinants of non-toxicity in the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *The Journal of Biological Chemistry* 278: 26734–26741.

- Lima V. P. & Rabenhorst S. H. B. (2009). Genes Associados à Virulência de *Helicobacter pylori*. *Revista Brasileira de Cancerologia* 54: 389-396.
- Liu K., Shi Y., Luo P., Yu S., Chen L., Zhao Z., Mao X., Guo G., Wu C. & Zou Q. (2011). Therapeutic efficacy of oral immunization with attenuated *Salmonella typhimurium* expressing *Helicobacter pylori* CagA, VacA and UreB fusion proteins in mice model. *Vaccine* 29: 6679-6685.
- Maeda S. & Mentis A. F. (2007). Pathogenesis of *Helicobacter pylori* infection. *Helicobacter* 12: 10-4.
- Mahdavi J., Sonden B., Hurting M., Olfat F. O., Forsberg L., Roche N., Angstrom J., Larsson T. L., Teneberg S., Karlsson K. A., Altraja S., Wadstrom T., Kersulyte D., Berg D. E., Dubois A., Petersson C., Magnusson K. E., Norberg T., Lindh F., Lundskog B. B., Arnqvist A., Hammarstrom L. & Boren T. (2002). *Helicobacter pylori* SabA adhesin in persistent infection and chronic inflammation. *Science* 297: 573-578.
- Marshall B. J. & Warren J. R. (1984). Unidentified curved bacilli in the stomach of patients with gastritis and peptic ulceration. *Lancet* i: 1311-1315.
- Mégraud F. & Lehours P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 280-322.
- Mégraud F. & Lehours P. (2007). *Helicobacter pylori* Detection and Antimicrobial Susceptibility Testing. *Clinical Microbiology Reviews* 20: 280-322.
- Mégraud F. (2004). *H. pylori* antibiotic resistance: prevalence, importance, and advances in testing. *Gut* 53: 1374-1384.
- Meridian Bioscience. *H. pylori*: Testing. Disponível em: <http://www.meridianbioscience.com/disease-information/h-pylori/testing.aspx> (acesso: 25 de Fevereiro de 2013).
- Mimuro H., Suzuki T., Nagai S., Rieder G., Suzuki M., Nagai T., Fujita Y., Nagamatsu K., Ishijima N., Koyasu S., Haas R. & Sasakawa C. (2007). *Helicobacter pylori* dampens gut epithelial self-renewal by inhibiting apoptosis, a bacterial strategy to enhance colonization of the stomach. *Cell Host Microbe* 2: 250-63.

- Mini R., Bernardini G., Salzano A. M., Renzone G., Scaloni A., Figura N. & Santucci A. (2006). Comparative proteomics and immunoproteomics of *Helicobacter pylori* related to different gastric pathologies. *Journal of chromatography* 833: 63-79.
- Montecucco C. & Berbard M. (2003). Molecular and cellular mechanisms of action of the vacuolating cytotoxin (VacA) and neutrophil-activating protein (HP-NAP) virulence fators of *Helicobacter pylori*. *Microbes and Infection* 5: 715–721.
- Monteiro M. A., Chan K. H., Rasko D. A., Taylor D. E., Zheng P. Y., Appelmek B. J., Wirth H. P., Yang M., Blaser M. J., Hynes S. O., Moran A. P. & Perry M. B. (1998). Simultaneous expression of type 1 and type 2 Lewis blood group antigens by *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides. Molecular mimicry between *H. pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. *Journal of Biological Chemistry* 273: 11533–11543.
- Moran A. P. (2007). Lipopolysaccharide in bacterial chronic infection: insights from *Helicobacter pylori* lipopolysaccharide and lipid A. *International Journal of Medical Microbiology* 297: 307–319.
- Moran A. P., Knirel Y. A., Senchenkova S. N., Widmalm G., Hynes S. O. & Jansson P. E. (2002). Phenotypic variation in molecular mimicry between *Helicobacter pylori* lipopolysaccharides and human gastric epithelial cell surface glycoforms. Acid-induced phase variation in Lewisx and Lewisy expression by *H. pylori* lipopolysaccharides. *Journal of Biological Chemistry* 277: 5785–5795.
- Mullaney E., Brown P. A., Smith S. M., Yamaoka Y. Y., Torres A. M., Kelleher D. P. & Windle H. S. (2009). Proteomic and functional characterization of the outer membrane vesicles from the gastric pathogen *Helicobacter pylori*. *Proteomics Clinical Applications* 3: 785–96.
- Müller I., Medina-Selby A., Palacios J. L., Martinez P., Opazo P., Bruce E., Mancilla M., Valenzuela P., Yudelevich A. & Venegas A. (2002). Cloning and comparison of tem gene sequences of a Chilean *H. pylori* strain with other *H. pylori* strains revealed higher variability for VacA and CagA virulence fators. *Biological Research* 35: 67-84.
- Necchi V., Candusso M. E. & Tava F. (2007). Intracellular, intercellular, and stromal invasion of gastric mucosa, pre-neoplastic lesions, and cancer by *Helicobacter pylori*, *Gastroenterology* 132: 1009–1023.

- Nilsson C., Skoglund A., Moran A. P., Annuk H., Engstrand L. & Normark S. (2008). Lipopolysaccharide Diversity Evolving in *Helicobacter pylori* Communities through Genetic Modifications in Fucosyltransferases. *PLoS ONE*, volume 3.
- Niv Y. (2008). *H. pylori* recurrence after successful eradication. *World Journal of Gastroenterology* 14: 1477-1478.
- Nystrom J. & Svennerholm A. M. (2007). Oral immunization with HpaA affords therapeutic protective immunity against *H. pylori* that is reflected by specific mucosal immune responses. *Vaccine* 25: 2591-2598.
- O'Connor A., Molina-Infante J., Gisbert J. P. & O'Morain C. (2013). Treatment of *Helicobacter pylori* infection 2013. *Helicobacter* 18 (1): 58–65.
- O'Riordan A. A., Morales V. A., Mulligan L., Faheem N., Windle H. J. & Kelleher D. P. (2012). Alkyl hydroperoxide reductase: A candidate *Helicobacter pylori* vaccine. *Vaccine* 30: 3876-3884.
- Odenbreit S., Wieland B. & Haas R. (1996). Cloning and Genetic Characterization of *Helicobacter pylori* Catalase and Construction of a Catalase-Deficient Mutant Strain. *Journal of Bacteriology* 178: 6960–6967.
- Olaofe O. A., Burton S. G., Cowan D. A. & Harrison S. T. L. (2010). Improving the production of a thermostable amidase through optimising IPTG induction in a highly dense culture of recombinant *Escherichia coli*. *Biochem Eng J* 52: 19-24.
- Oldani A., Cormont M., Hofman V., Chiozzi V., Oregioni O., Canonici A., Sciullo A., Sommi P., Fabbri A., Ricci V. & Boquet P. (2009). *Helicobacter pylori* counteracts the apoptotic action of its VacA toxin by injecting the CagA protein into gastric epithelial cells. *PLOS Pathogens* 5: e1000603.
- Oleastro M. & Ménard A. (2013). The role of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Proteins in Adherence and Pathogenesis. *Biology* 2: 1110-1134.
- Olofsson A., Vallström A., Petzold K., Tegtmeyer N., Schleucher J., Carlsson S., Haas R., Backert S., Wai S. N., Gröbner G. & Arnqvist A. (2010). Biochemical and functional characterization of *Helicobacter pylori* vesicles. *Molecular Microbiology* 77: 1539-1555.

- Parker H., Chitcholton K., Hampton M. B. & Keenan J. I. (2010). Uptake of *Helicobacter pylori* Outer Membrane Vesicles by Gastric Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 78: 5054-5061.
- Parkin D. M. (2006). The global health burden of infection-associated cancers in the year 2002. *International Journal of Cancer* 118: 3030-3044.
- Petersen A. M. & Krogfelt K. A. (2003). *Helicobacter pylori*: an invading microorganism? A review. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 36: 117– 126.
- Portal-Celhay C. & Perez-Perez G. I. (2006). Immune responses to *Helicobacter pylori* colonization: mechanisms and clinical outcomes. *Clinical Science* 110: 305-314.
- Prinz C., Hafsi N. & Voland P. (2003). *Helicobacter pylori* virulence factors and the host immune response: implications for therapeutic vaccination. *TRENDS in Microbiology* 11: 134-138.
- Prinz C., Schöniger M., Rad R., Becker I., Keiditsch E., Wagenpfeil S., Classen M., Rösch T., Schepp W. & Gerhard M. (2001). Key importance of the *Helicobacter pylori* adherence factor blood group antigen binding adhesin during chronic gastric inflammation. *Cancer Research* 61: 1903-9.
- Qian B., Ma S., Shang L., Qian J. & Zhang G. (2011). Effects of *Helicobacter pylori* eradication on gastroesophageal reflux disease. *Helicobacter* 16: 255-65.
- Ramos C. R., Abreu P. A., Nascimento A. L. & Ho P. L. (2004). A high-copy T7 *Escherichia coli* expression vector for the production of recombinant proteins with a minimal N-terminal His-tagged fusion peptide. *Braz J Med Biol Res* 37: 1103-1109.
- Redéen S., Petersson F., Törnkrantz E., Levander H., Mardh E. & Borch K. (2011). Reliability of diagnostic tests for *Helicobacter pylori* infection. *Gastroenterology Research and Practice*: 6 páginas.
- Replogle W. H., Johnson W. D. & Hoover K. W. (2009). Using Evidence to Determine Diagnostic Test Efficacy. *Worldviews on Evidence-Based Nursing* 6: 87–92.
- Rossi G., Ruggiero P., Peppoloni S., Pancotto L., Fortuna D., Lauretti L., Volpini G., Mancianti S., Corazza M., Taccini E., Di pisa F., Rappuoli R. & Del Giudice G. (2004). Therapeutic vaccination against *Helicobacter pylori* in the beagle dog experimental model: safety, immunogenicity, and efficacy. *Infection and Immunity* 72: 3252-3259.

- Ruggiero P., Peppoloni S., Rappuoli R. & Giudice G. D. (2003). The quest for a vaccine against *Helicobacter pylori*: how to move from mouse to man?. *Microbes and Infection* 5: 749-756.
- Rupnow M.F., Owens D.K., Shachter R. & Parsonnet J. (1999). *Helicobacter pylori* vaccine development and use: a cost-effectiveness analysis using the Institute of Medicine methodology. *Helicobacter* 4: 272-280.
- Sachs G. & Scott D. R. (2012). *Helicobacter pylori*: Eradication or Preservation. *Medicine Reports*: 5 páginas.
- Salama N. R., Gonzalez-Valencia G., Deatherage B., Aviles-Jimenez F., Atherton J. C., Graham D. Y. & Torres J. (2007). Genetic Analysis of *Helicobacter pylori* Strain Populations Colonizing the Stomach at Different Times Postinfection. *Journal of Bacteriology* 189: 3834-3845.
- Salyers A. A. & Whitt D. D. (2002). Bacterial Pathogenesis: a molecular approach. 2ª edição. ASM Press. Washington D.C.
- Schistosomes, liver flukes and *Helicobacter pylori*. (1994) IARC Working Group on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans. Lyon. IARC Monographs on Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans 61:1-241.
- Segal E. D., Cha J., Lo J., Falkow S. & Tompkins L. S. (1999). Altered states: involvement of phosphorylated CagA in the induction of host cellular growth changes by *Helicobacter pylori*. *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 96: 14559-14564.
- Segal E. D., Falkow S. & Tompkins L. S. (1996). *Helicobacter pylori* attachment to gastric cells induces cytoskeletal rearrangements and tyrosine phosphorylation of host cell proteins. . *Proceedings of the National Academy of Sciences USA* 93: 1259-1264.
- Shao S.-H., Wang H., Chai S.-G. & Liu L.M. (2005). Research progress on *Helicobacter pylori* outer membrane protein. *World Journal of Gastroenterology* 11: 3011-3013.
- Shi T., Liu W. Z., Gao F., Shi G. Y. & Xiao S. D. (2005). Intranasal CpG oligodeoxynucleotide is a potent adjuvant of vaccine against *Helicobacter pylori*, and T helper 1 type response and interferon gamma correlate with the protection. *Helicobacter* 10: 71-79.
- Solnick J. V., Hansen L. M., Salama N. R., Boonjakuakul J. K. & Syvanen M. (2004). Modification of *Helicobacter pylori* outer membrane protein expression during experimental

- infection of *rhesus macaques*. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101: 2106–2111.
- Suerbaum S. & Michetti P. (2002). *Helicobacter pylori* infection. *N Engl J Med* 347: 1175–1186.
- Tanabe S., Hinode D., Yokoyama M., Fukui M., Nakamura R., Yoshioka M., Grenier D. & Mayrand D. (2003). *Helicobacter pylori* and *Campylobacter rectus* share a common antigen. *Oral Microbiology Immunology* 18: 79–87.
- Tang R. X., Luo D. J., Sun A. H. & Yan J. (2008). Diversity of *Helicobacter pylori* isolates in expression of antigens and induction of antibodies. *World Journal of Gastroenterology* 14: 4816–22.
- Tannaes T. & Bukholm G. (2005). Cholesteryl-6-O-acyl- α -D-glucopyranoside of *Helicobacter pylori* relate to relative lysophospholipid content. *FEMS Microbiology Letters* 244: 117–120.
- Tannaes T., Bukholm I. K. & Bukholm G. (2005). High relative content of lysophospholipids of *Helicobacter pylori* mediates increased risk for ulcer disease. *FEMS Immunology & Medical Microbiology* 44: 17–23.
- Tegmeyer N., Wittelsberger R., Hartig R., Wessler S., Martinez-Quiles N. & Backert S. (2011) Serine Phosphorylation of Cortactin Controls Focal Adhesion Kinase Activity and Cell Scattering Induced by *Helicobacter pylori*. *Cell Host Microbe* 9: 520–31.
- Teich A., Lin H. Y., Andersson L., Meyer S. & Neubauer P. (1998). Amplification of ColE1 related plasmids in recombinant cultures of *Escherichia coli* after IPTG induction. *J Biotechnol* 64: 197–210.
- Terebiznik M. R., Vazquez C. L., Torbicki K., Banks D., Wang T., Hong W., Blanke S. R., Colombo M. I. & Jones N. L. (2006). *Helicobacter pylori* VacA Toxin promotes Bacterial Intracellular Survival in Gastric Epithelial Cells. *Infection and Immunity* 74: 6599–6614.
- Terpe K. (2003). Overview of tag protein fusions: from molecular and biochemical fundamentals to commercial systems. *Applied Microbiology and Biotechnology* 60: 523–533.
- The Sequence Manipulation Suite. (2004). Disponível em: <http://www.ualberta.ca/~stothard/javascript/index.html>. (acesso a: 19 de Fevereiro de 2014).

- Triccas J. A., Parish T., Britton W. J. & Gicquel B. (1998). An inducible expression system permitting the efficient purification of a recombinant antigen from *Mycobacterium smegmatis*. *FEMS Microbiol Lett* 167: 151-156.
- Tombola F., Morbiato L., Del Giudice G., Rappuoli R., Zoratti M. & Papini E. (2001). The *Helicobacter pylori* VacA toxin is a urea permease that promotes urea diffusion across epithelia. *The Journal of Clinical Investigation* 108: 929–937.
- Tonkic A., Tonkic M., Lehours P. & Mégraud F. (2012). Epidemiology and Diagnosis of *Helicobacter pylori* Infection. *Helicobacter* 17: 1-8.
- Unemo M., Aspholm-Hurtig M., Ilver D., Bergstrom J., Boren T., Danielsson D. & Teneberg S. (2005). The sialic acid binding SabA adhesin of *Helicobacter pylori* is essential for nonopsonic activation of human neutrophils. *The Journal of Biological Chemistry* 280: 15390–15397.
- Vaira D., Gatta L., Ricci C. & Miglioli M. (2002). Review article: diagnosis of *Helicobacter pylori* infection. *Alimentary Pharmacology & Therapeutics* 16: 16-23.
- Vajdy M., Singh M., Ugozzoli M., Briones M., Soenawan E., Cuadra L., Kazzaz J., Ruggiero P., Peppoloni S., Norelli F., del Giudice G., O'Hagan D. (2003). Enhanced mucosal and systemic immune responses to *Helicobacter pylori* antigens through mucosal priming followed by systemic boosting immunizations. *Immunology* 110: 86-94.
- Visciano M. L., Tagliamonte M., Tornesello M. L., Buonaguro F. M. & Buonaguro L. (2012). Effects of adjuvant on IgG subclasses elicited by virus-like particles. *Journal of Translational Medicine* 10: 1-8.
- Vitoriano I., Rocha-Gonçalves A., Carvalho T., Oleastro M., Calado C. R. C. & Roxo-Rosa M. (2011). Antigenic Diversity Among Portuguese Clinical Isolates of *Helicobacter pylori*. *Helicobacter* 16: 153-168.
- Voland P., Hafsi N., Zeitner M., Laforsch S., Wagner H. & Prinz C. (2003). Antigenic Properties of HpaA and Omp18, Two Outer Membrane Proteins of *Helicobacter pylori*. *Infection and Immunity* 71: 3837–3843.
- Walker J. M. (2009). The protein protocols handbook. New York, N.Y.: Humana Press.

- Wang C., Yuan Y., Hunt R. H. (2009). *Helicobacter pylori* infection and Barrett's esophagus: a systematic review and meta-analysis. *The American Journal of Gastroenterology* 104: 492-500.
- Wang G., Hong Y., Olczak A., Maier S. & Maier R. (2006). Dual Roles of *Helicobacter pylori* NapA in Inducing and Combating Oxidative Stress. *Infection and Immunity* 74: 6839-6846.
- Wannamacher L. (2011). Review of the evidence for *H. pylori* treatment regimens. 18th Expert Committee on the Selection and Use of Essential Medicines.
- Wen S. & Moss S. F. (2009). *Helicobacter pylori* virulence factors in gastric carcinogenesis. *The Cancer letter* 282: 1-8.
- Weng Y. P., Hsu F. C., Yang W. S. & Chen H. P. (2006). Optimization of the overexpression of glutamate mutase S component under the control of T7 system by using lactose and IPTG as the inducers. *Enzyme Microb Tech* 38: 465-469.
- Yang W. C., Chen L., Li H. B., Li B., Hu J., Zhang J. Y., Yang S. M., Zou Q. M., Guo H. & Wu C. (2013). Identification of two novel immunodominant UreB CD4+ T cell epitopes in *Helicobacter pylori* infected subjects. *Vaccine* 31: 1204-1209.
- Yamaoka Y. (2010). Mechanisms of disease: *Helicobacter pylori* virulence factors. *Nature Reviews Gastroenterology & Hepatology* 7: 629-641.
- Yvonne T. H. O., van Duynhoven & Jonge R. (2001). Transmission of *Helicobacter pylori*: a role for food?. *Bulletin of the World Health Organization* 79 (5): 455-460.
- Zhang H. Y., Sun S. H., Guo Y. J., Zhou F. J., Chen Z. H., Lin Y. & Shi K. (2003). Immune response in mice inoculated with plasmid DNAs containing multiple-epitopes of foot-and-mouth disease virus. *Vaccine* 21:4704-4707.
- Zhao W., Wu W. & Xu X. (2007). Oral vaccination with liposome-encapsulated recombinant fusion peptide of urease B epitope and cholera toxin B subunit affords prophylactic and therapeutic effects against *H. pylori* infection in BALB/c mice. *Vaccine* 25: 7664-7673.
- Zhou W., Shi Y., Wu C., Zhang W., Mao X., Guo G., Li H. & Zou Q. (2009). Therapeutic efficacy of a multi-epitope vaccine against *Helicobacter pylori* infection in BALB/c mice model. *Vaccines* 27: 5013-5019.

ANEXO – SEQUÊNCIA GENÉTICA E RESPETIVA PROTEÍNA DO EPÍTOPO NAPA

```
      1      11      21      31      41      51
1  GCGGATCCAGGCCGAAAGGGCTCTGCCCCAGGCACCCCTGACTTCTTCAACGTGCACA
1(+3)  R  I  Q  A  G  K  G  S  A  P  G  T  P  D  F  F  N  V  H

      61
20(+3)  K  A  T  E  E  I  Y  E  E  F  A  D  M  F  D  D  L  A  E  R

      121
40(+3)  I  V  Q  L  G  H  H  P  L  V  T  L  S  E  A  L  K  L  T  R

      181
60(+3)  V  K  E  E  T  K  T  S  A  P  G  T  P
```